

**DETERMINACIÓN A ESCALA DE LABORATORIO DE LAS VARIABLES MÁS  
IMPORTANTES PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE ALMIDÓN  
DE YUCA**

**SANDRA XIMENA LEZAMA HERNÁNDEZ**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS DE PRODUCCIÓN  
PROGRAMA INGENIERÍA DE PRODUCCIÓN  
SANTIAGO DE CALI  
2006**

**DETERMINACIÓN A ESCALA DE LABORATORIO DE LAS VARIABLES MÁS  
IMPORTANTES PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE ALMIDÓN  
DE YUCA**

**SANDRA XIMENA LEZAMA HERNÁNDEZ**

**Trabajo de grado para optar al título de Ingeniera de Producción**

**Directora**

**LUZ MARINA FLOREZ PARDO. Ph.D.**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS DE PRODUCCIÓN  
PROGRAMA INGENIERÍA DE PRODUCCIÓN  
SANTIAGO DE CALI**

**2006**

**Nota de aceptación:**

Aprobado por el Comité de Grado  
en cumplimiento de los requisitos  
exigidos por la Universidad  
Autónoma de Occidente para optar  
al título de Ingeniera de Producción.

**JORGE ENRIQUE LÓPEZ GALÁN**

Jurado

Santiago de Cali, 27 de Julio de 2006

Este proyecto se lo dedico a Dios, mis hijos, padres y esposo que me han colaborado con su tiempo y apoyo para el éxito y culminación de mi carrera.

Gracias a ustedes,

SANDRA XIMENA LEZAMA H.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco de manera muy especial y con aprecio a mis asesores los Doctores Luz Marina Florez P. y Álvaro Lozano Urriago que me colaboraron en la elaboración de este proyecto con sus conocimientos y el tiempo que le dedicaron al mismo.

Al personal de los Laboratorios de Ciencias Ambientales y Química de la Universidad Autónoma de Occidente, que con su apoyo contribuyeron para el desarrollo y culminación de dicho proyecto.

## CONTENIDO

	Pág.
GLOSARIO	16
RESUMEN	17
INTRODUCCIÓN	18
JUSTIFICACIÓN	23
1. MARCO TEÓRICO	27
1.1. GENERALIDADES DEL ALMIDÓN	27
1.1.1. Propiedades fisicoquímicas de los almidones	30
1.1.2. Aplicaciones del almidón	32
1.1.3. El almidón de yuca y otros almidones	33
1.2. GELATINIZACIÓN	35
1.2.1. Etapas de la Gelatinización	37
1.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	38

	<b>Pág.</b>
1.3.1. Las $\alpha$ -amilasas	41
1.3.2. Las $\beta$ -amilasas	44
1.3.3. Las Glucoamilasas	45
1.4. FERMENTACIÓN	45
1.4.1. Producción de Etanol en la Fermentación	46
1.4.1.1. Glucólisis	47
1.4.1.2. Fermentación alcohólica	50
1.4.1.3. Microorganismos utilizados en la fermentación alcohólica	52
1.4.2. Factores de crecimiento	57
1.4.3. Cinética del crecimiento de los microorganismos	59
1.5. DESTILACIÓN	61
1.5.1. Clasificación de la destilación	62
1.5.1.1. Destilación Simple	62
1.5.1.2. Destilación fraccionada	63

	<b>Pág.</b>
1.5.1.3. Destilación al vacío	63
1.5.1.4. Destilación por arrastre de vapor	64
2. MATERIALES Y METODOS	65
2.1. MATERIALES	65
2.1.1. Almidón de yuca	65
2.1.2. Enzimas	66
2.2. GELATINIZACIÓN DEL ALMIDÓN DE YUCA	66
2.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN DE YUCA	67
2.3.1. Procedimiento	67
2.3.2. Diseño de experimentos para la hidrólisis del almidón de yuca	69
2.3.3. Diseño Factorial	69
2.3.4. Determinación de las variables y sus niveles	69
2.3.5. Método para el análisis de la variables de proceso	69
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS	73



	<b>Pág.</b>
3.1. GELATINIZACIÓN DEL ALMIDÓN DE YUCA	73
3.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN DE YUCA	76
3.2.1. Resultados obtenidos con la enzima <i>Spezyme Fred</i>	76
3.2.2. Resultados obtenidos con la enzima <i>Optidex</i>	90
3.3 FERMENTACIÓN Y DESTILACIÓN	104
4. CONCLUSIONES	107
5. RECOMENDACIONES	109
BIBLIOGRAFÍA	110

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Proyectos en firme de producción de etanol en Colombia	23
<b>Tabla 2.</b> Proyectos con estudio de factibilidad para la producción de etanol en Colombia	24
<b>Tabla 3.</b> Composición química de los almidones más comunes	31
<b>Tabla 4.</b> Viscosidad de algunos almidones	32
<b>Tabla 5.</b> Contenido de amilosa en los almidones más comunes	34
<b>Tabla 6.</b> Temperatura de gelatinización de algunos almidones	36
<b>Tabla 7.</b> Crecimiento de microorganismos en la fermentación	60
<b>Tabla 8.</b> Identificación del almidón utilizado	65
<b>Tabla 9.</b> Descripción de las variables a analizar con <i>Spezyme Fred</i>	70
<b>Tabla 10.</b> Ensayos de optimización con <i>Spezyme Fred</i>	71

	Pág.
<b>Tabla 11.</b> Descripción de las variables a analizar con <i>Optidex</i>	72
<b>Tabla 12.</b> Ensayos de optimización con <i>Optidex</i>	72
<b>Tabla 13.</b> Resultados en la gelatinización	74
<b>Tabla 14.</b> Variables de proceso para la <i>Spezyme Fred</i>	77
<b>Tabla 15.</b> Resultados de familiarización con <i>Spezyme Fred</i>	78
<b>Tabla 16.</b> Resultados hidrólisis enzimática con <i>Spezyme Fred</i>	79
<b>Tabla 17.</b> Tabla ANOVA para <i>Spezyme Fred</i>	81
<b>Tabla 18.</b> Resultados estimados para el % hidrólisis	87
<b>Tabla 19.</b> Variables de proceso para <i>Optidex</i>	90
<b>Tabla 20.</b> Ensayos de familiarización para <i>Optidex</i>	91
<b>Tabla 21.</b> Resultados hidrólisis enzimática del almidón con <i>Optidex</i>	92

<b>Tabla 22.</b> Tabla ANOVA para <i>Optidex</i>	93
<b>Tabla 23.</b> Resultados estimados para el % hidrólisis	98
<b>Tabla 24.</b> Rendimiento obtenido con la combinación de las enzimas	102

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Esquema simplificado para la producción de etanol a partir de biomasa y contribución a la reducción de las emisiones causantes del calentamiento global del planeta	25
<b>Figura 2.</b> Estructura de la amilosa y la amilopectina	28
<b>Figura 3.</b> Estructura interna de un grano de almidón	30
<b>Figura 4.</b> Hidrólisis del almidón	39
<b>Figura 5.</b> Molécula de glucosa	40
<b>Figura 6.</b> Representación de la estructura del glucógeno	43
<b>Figura 7.</b> Representación de la hidrólisis de un polisacárido	44
<b>Figura 8.</b> Representación del proceso de producción de etanol en la fermentación alcohólica	46
<b>Figura 9.</b> Representación de la glucólisis	47

	Pág.
<b>Figura 10.</b> Primera fase de la glucólisis	48
<b>Figura 11.</b> Segunda fase de la glucólisis	49
<b>Figura 12.</b> Representación de la obtención de etanol a partir del piruvato	50
<b>Figura 13.</b> Imagen de microscopía electrónica de barrido de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
<b>Figura 14.</b> Crecimiento microbiano en la fermentación	59
<b>Figura 15.</b> Relación Tiempo – Temperatura para las diferentes concentraciones de almidón de yuca en las soluciones	75
<b>Figura 16.</b> Relación entre la concentración de almidón de yuca y la viscosidad	76
<b>Figura 17.</b> Grafica de Pareto. Enzima <i>Spezyme Fred</i>	83

<b>Figura 18.</b> Efectos de las variables sobre el % de Hidrólisis	84
<b>Figura 19.</b> Efecto de las interacciones de las variables sobre el % hidrólisis	85
<b>Figura 20.</b> Gráfica de superficie de respuesta para la enzima <i>Spezyme</i>	88
<b>Figura 21.</b> Contornos estimados de la superficie de respuesta	89
<b>Figura 22.</b> Grafica de Pareto. Enzima <i>Optidex</i>	94
<b>Figura 23.</b> Efecto de las variables sobre el % Hidrólisis	95
<b>Figura 24.</b> Efecto de las interacciones de las variables sobre el % hidrólisis	96
<b>Figura 25.</b> Gráfica de Superficie de respuesta para la enzima <i>Optidex</i>	99
<b>Figura 26.</b> Contornos estimados de la superficie de respuesta	100

## **GLOSARIO**

**BIRREFRINGENCIA**, fenómeno que consiste en que un haz luminoso, estrecho y monocromático, al penetrar en ciertos materiales da lugar simultáneamente a dos haces refractados distintos. Los medios que poseen esta propiedad se llaman birrefringentes. Los sólidos cristalinos, salvo los del sistema cúbico, son birrefringentes

**BIOMASA**, el término relativo a la energía, es el combustible energético que se obtiene directa o indirectamente de recursos biológicos. La energía de biomasa que procede de la madera, residuos agrícolas y estiércol, continúa siendo la fuente principal de energía de las zonas en desarrollo.

**LIXIVIACIÓN**, es una operación de transferencia de masa cuyo objetivo es el de separar un compuesto (soluto) de una fase sólida utilizando un disolvente líquido selectivo.

**RETROGRADACIÓN**, fenómeno que se produce cuando las pastas o engrudos son almacenados.



## RESUMEN

En el presente trabajo se exploró el efecto de las variables más relevantes en el proceso de hidrólisis enzimática del almidón de yuca comercial, a escala de laboratorio, con el fin de determinar las condiciones más apropiadas para obtener etanol. Se emplearon dos enzimas diferentes, la  $\alpha$ -amilasa **Spezyme®** y la  $\alpha$ -glucoamilasa **Optidex® de Genencor International** que han mostrado ser eficientes en otro tipo de almidones como el extraído a partir del maracuyá. Para la fermentación alcohólica se utilizó por disponibilidad, una cepa de *Sacharomyces cerevisiae* de panadería.

En la hidrólisis como de sacarificación se trabajó con un diseño factorial del tipo  $2^n$ , donde se trabajó cada variable en dos niveles, teniendo como variable respuesta el porcentaje de hidrólisis de almidón. Las variables estudiadas fueron: la temperatura de sacarificación (50 – 70 °C), el pH (5 – 7), la concentración del almidón (10 – 20% w/w), tiempo de sacarificación (5 – 55 min) y la dosis de enzima, cuyos rangos variaron dependiendo del tipo de enzima (para la  $\alpha$ -amilasa de 2  $\mu$ l / g a 4  $\mu$ l / g y para la  $\alpha$ -glucoamilasa de 1  $\mu$ l / g a 12  $\mu$ l / g). Estos rangos se establecieron después de hacer consultas bibliográficas y de hacer ensayos de familiarización. De acuerdo con los resultados del ANOVA se encontró que las variables que tienen mayor incidencia sobre la hidrólisis con la  $\alpha$ -amilasa fueron la temperatura y la concentración del almidón y sobre la sacarificación con la  $\alpha$ -glucoamilasa fue la concentración del almidón. Con la combinación de las dos enzimas se obtuvo un rendimiento del 94,7% en la hidrólisis del almidón de yuca manteniendo un pH de 6.0, tiempo de sacarificación para cada enzima de 30 min, una concentración de almidón de 15% y una dosis de enzima de 4  $\mu$ l / g y 12  $\mu$ l / g, para la  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucoamilasa respectivamente.

## INTRODUCCIÓN

El ser humano a través de la historia ha empleado diferentes fuentes de energía de recursos renovables y no renovables. Por razones económicas y de uso, éstos últimos han sido más explotados.

El mundo encara el agotamiento progresivo de sus recursos energéticos no renovables; al mismo tiempo, el consumo de combustibles aumenta a ritmos cada vez más crecientes, por esta razón la alternativa a corto y mediano plazo, es pensar en recursos energéticos renovables. Estos recursos, tienen la ventaja de generar un balance energético positivo en el ciclo de vida del producto, ya que las emisiones de CO<sub>2</sub> generadas por la producción y uso de biocombustibles son compensadas por la absorción de CO<sub>2</sub> durante el crecimiento de las plantas y de otros materiales vegetales a partir de los cuales dichos combustibles se producen<sup>1</sup>.

El etanol producido a partir de fuentes renovables, es una apuesta fuerte para el futuro de los biocombustibles. El alcohol cuando se mezcla con la gasolina en los motores de combustión interna, eleva su contenido en O<sub>2</sub>. Este oxígeno adicional aumenta la eficiencia en la combustión con lo que se reducen las emisiones de CO hasta en un 25%, el material particulado en un 50% y los compuestos orgánicos volátiles en un 7%. En consecuencia, Colombia eliminó el uso del tetraetilo de plomo (TEP) un antidetonante tóxico y contaminante, usado tradicionalmente en la gasolina de bajo octanaje y lo substituyó por etanol o alcohol etílico de origen vegetal (Ley 693 de 2001). Ahora las gasolinas contienen

---

<sup>1</sup> SHIGECHI, H; UYAMA, K; FUJITA, Y; MATSUMOTO, T; UEDA, M; TANAKA, A. Efficient ethanol production from starch through development of novel flocculent yeast strains displaying glucoamylase and co-displaying or secreting  $\alpha$ -amylase [en línea]. Journal of molecular catalysis, 2002. [consultado 25 de oct, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.elsevier.com/locate/molcatb>

principalmente dos compuestos oxigenados: el alcohol etílico deshidratado al 99.6% y el metil terbutil éter (MTBE)<sup>2</sup>.

El etanol se obtiene entre otras materias primas a partir de los jugos o las mieles de la caña de azúcar en países tropicales como Brasil e India. En algunos países europeos como Francia, se obtiene a partir de melazas de remolacha azucarera y en los Estados Unidos, la materia prima principal es el almidón de Maíz (Madson y Monceaux, 1995).

Se conocen globalmente dos procesos principales para la producción de etanol: la química y la biológica. La primera, se fundamenta en el uso del etano obtenido del gas natural o de cualquier corriente petrolífera rica en etileno, posteriormente este último compuesto es hidroxilado para convertirlo en etanol el cual es separado por destilación y convertido en etanol. La segunda, posee cuatro pasos diferentes para su producción<sup>3</sup>:

- ❖ Uso de las plantas para obtener carbono orgánico (biomasa) mediante la fijación fotosintética del dióxido de carbono del aire.
- ❖ Obtener de esta biomasa la materia prima principal, bien sea en forma de azúcares simples como la glucosa o la sacarosa, o de biopolímeros complejos como los almidones, la celulosa y la hemicelulosa. Para ello se hace uso de diferentes cultivos con elevada productividad en el trópico: la caña que contiene sacarosa; los cereales y las raíces o tubérculos que poseen almidones, y en general cualquier cultivo que tenga un alto contenido en celulosa. El uso de cualquiera de estas materias primas incide directamente en el proceso tecnológico a ser empleado.

---

<sup>2</sup> Se despeja el camino para los alcoholes carburantes en Colombia [en línea]. Bogotá: CORPODIB, 2005. [consultado 18 de nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.infocorpodib.com>.

<sup>3</sup> ABC de los alcoholes carburantes [en línea]. Bogotá: Federación Nacional de Biocombustibles, 2005. [consultado 20 de nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.abcalcoholescarburantes.com>.

- ❖ Aplicar un proceso biotecnológico para transformar la materia prima en etanol, para lo cual se emplean biocatalizadores (enzimas) y/o microorganismos como bacterias, levaduras y mohos. Una de estas tecnologías es la clásica fermentación alcohólica que se basa en la transformación de la glucosa en etanol y gas carbónico, conocida por el hombre desde la aparición de las primeras civilizaciones que poblaron la tierra.
- ❖ Concentrar, purificar y deshidratar para obtener etanol grado combustible y aprovechar los subproductos del proceso para la elaboración de alimentos, calor, electricidad o simplemente materiales de construcción.

El almidón de la yuca o la sacarosa de la caña, es solo una pequeña fracción de biomasa que puede ser obtenida de un determinado cultivo. El resto de la biomasa requiere de la aplicación de otras tecnologías para su aprovechamiento total, y algunas de éstas se encuentran a nivel de desarrollo experimental por parte de distintos laboratorios y empresas del mundo.

En el Brasil se introdujo el uso del alcohol combustible para automotores hace cerca de 30 años. En Estados Unidos la producción de etanol carburante está creciendo. En 1996, los productores estadounidenses colocaron en el mercado 3.500 millones de litros de alcohol y en 2002 la cifra dio un salto a 7.000 millones de litros. Se utiliza principalmente en mezclas del 10% en la gasolina. Existe ya una nueva legislación que triplicará la demanda de etanol, la cual puede alcanzar la cifra de 17.500 millones de litros en el mediano plazo. Canadá exige una mezcla del 10% en las regiones más contaminadas. México adoptará próximamente la misma solución para atender los graves problemas de su ciudad capital. Japón, con una flota de 72.6 millones de vehículos, se prepara para importar crecientes volúmenes de alcohol del Brasil. Tailandia por ley obliga a adicionar 10% de alcohol en la gasolina en áreas ambientalmente problemáticas. La China adelanta

pruebas con alcohol y crea una demanda inicial de 7.000 millones de toneladas al año. La Unión Europea, donde se trata la cuestión ambiental con mayor urgencia, deberá utilizar en todos los países, a partir del 2005, por lo menos el 10% de biocombustibles, conforme a una resolución del Parlamento Europeo. En el 2010 la proporción deberá aumentar al 5.75% en la gasolina<sup>4</sup>.

En Colombia, particularmente en el Valle del Cauca, cinco ingenios azucareros ya iniciaron la producción de etanol a partir del jugo o las mieles extraídas de la caña de azúcar para llegar a una cantidad cercana a 1.200.000 l/día. Con el fin de acceder a la venta de los bonos de reducción de emisiones de los países firmantes del protocolo de Kyoto, el país está pensando en aumentar la mezcla gasolina-etanol a un porcentaje mayor al 10%. Para esto debe disponer de materias primas diferentes a la caña, ya que en un futuro cercano en el Valle, no habrá disponibilidad de suelos ni de agua aptos para su cultivo. En este contexto la yuca se convierte en una buena alternativa porque no es tan exigente en la calidad de las tierras para su cultivo y su rendimiento por hectárea es relativamente alto<sup>5</sup>.

No existen muchos estudios sobre la producción de etanol a partir de la yuca, por lo que es estratégico empezar a tener experiencia en el conocimiento de las variables que afectan el proceso de la producción del mismo y que hagan más rentable el proceso comparado con el que se obtiene a partir de la caña de azúcar. Por lo tanto es importante impulsar otro tipo de proyectos que se basen en materias primas diferentes al azúcar de la caña que podrían generar más empleos por hectárea durante la siembra y cosecha del producto, además de buscar

---

<sup>4</sup> Se despeja el camino para los alcoholes carburantes en Colombia [en línea]. Bogotá: CORPODIB, 2005. [consultado 18 de nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.infocorpodib.com>

<sup>5</sup> ABC de los alcoholes carburantes [en línea]. Bogotá: Federación Nacional de Biocombustibles, 2005. [consultado 20 de nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.abcalcoholescarburantes.com>

tecnologías más limpias y menos costosas. Tal es el caso potencial del alcohol obtenido a partir del almidón de yuca; pero para ello hay que mejorar la hidrólisis del almidón en cuanto a tiempo y costos, haciendo entre otros, estudios de comportamientos de las variables involucradas dentro de los diferentes procesos, con lo cual igualmente se puede disminuir el volumen de vinaza producida por litro de alcohol y el contenido de materia orgánica e inorgánica dentro de la misma.

## JUSTIFICACIÓN

Mediante la Ley 693 del 2001 el Congreso de la República aprobó el proyecto de mezclar alcohol carburante con gasolina en una proporción del 10% (v/v). Esta Ley se sancionó con el objetivo de disminuir la emisión de gases contaminantes emitidos por los automotores como el monóxido y el dióxido de carbono, que contribuyen con la generación del Efecto Invernadero y con parte del desequilibrio en el clima mundial<sup>6</sup>.

Las cifras oficiales dan cuenta que Colombia necesita cerca de 1 millón de toneladas de etanol carburante por año. La mayor parte de esta demanda está siendo satisfecha por las destilerías que empezaron a funcionar entre noviembre (Incauca y Providencia) del 2005 y marzo del 2006 (Manuelita, Mayagüez y Risaralda) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Plantas productoras en Colombia de etanol carburante.

Región	Inversionistas	Capacidad	Fuente
Cauca	Ingenio del Cauca	300.000 l./día	Caña de azúcar
Valle del Cauca	Ingenio La Manuelita	250.000 l./día	Caña de azúcar
Valle del Cauca	Ingenio Mayagüez	150.000 l./día	Caña de azúcar
Valle del Cauca	Ingenio Providencia	250.000 l./día	Caña de azúcar
Risaralda	Ingenio Risaralda	75.000 l./día	Caña de azúcar

Fuente: ABC de los alcoholes carburantes [en línea]. Bogotá: Federación Nacional de Biocombustibles, 2005. [Consultado 20 de nov, 2005]. Disponible en Internet. <http://www.abcalcoholescarburantes.com>.

---

<sup>6</sup> ABC de los alcoholes carburantes [en línea]. Bogotá: Federación Nacional de Biocombustibles, 2005. [consultado 20 de nov, 2005]. Disponible en Internet. <http://www.abcalcoholescarburantes.com>.

La mayor parte de esta producción solo se ha podido distribuir entre Bogotá y el sur occidente colombiano, ya que la estructura de precios no permite que este biocombustible pueda llegar a otras regiones. En la parte norte, central y oriental del país se encuentran en estudio varios proyectos como se puede observar en la tabla 2.

**Tabla 2.** Proyectos con estudio de factibilidad para la producción de etanol en Colombia

Región	Promotora	Capacidad	Fuente
Santander-Boyacá	Mieles S.A.	100.000 l/día	Caña de azúcar
Santander-Boyacá	Alcol S.A.	150.000 l/día	Caña de azúcar
Meta	Petrotesting S.A.	20.000 l/día	Yuca
Quindío	Gobernación	150.000 l/día	Caña de azúcar
Boyacá	Maquilagro/Inverlink	300.000 l/día	Remolacha

Fuente: ABC de los alcoholes carburantes [en línea]. Bogotá: Federación Nacional de Biocombustibles, 2005. [Consultado 20 de nov, 2005]. Disponible en Internet. <http://www.abcalcoholescarburantes.com>.

Como se observa en esta tabla, en estas regiones se está analizando la posibilidad de trabajar con materias primas diferentes al jugo de la caña como la remolacha y el almidón de la yuca. Los estudios con remolacha azucarera están un poco atrasados debido a que su cultivo hasta ahora se está introduciendo en el país, aspecto que no sucede con la yuca, cuyo cultivo es ancestral. Hay una compañía petrolera en el departamento del Meta que ya inició la construcción de la planta como se muestra en la tabla 2. Igualmente existe una fábrica en el Cesar (Ingenio Sicarare) que lleva un año produciendo cerca de 38.000 litros por día de



etanol al 96% a partir de la misma fuente. Estas empresas tienen problema de disponibilidad de materia prima. A pesar de estas dificultades, la extracción de etanol a partir de almidones es promisorio, sobre todo porque en el mundo ya se producen cantidades importantes de etanol a partir de otro tipo de almidones como los extraídos a partir de maíz, trigo, arroz, sorgo y papa, producidas en proporciones importantes alrededor del mundo<sup>7</sup> (Figura1).

**Figura 1.** Ciclo de vida del alcohol carburante



Fuente: El Etanol carburante como motor del desarrollo rural y agroindustrial del país [en línea]. Venezuela: Portal del oriente venezolano, 2005. [Consultado 11 de no, 2005]. Disponible por Internet: <http://www.enorient.com>

Aunque el proceso de obtención de etanol a partir de almidones inicialmente puede ser más costoso y complejo que el de la destilación de alcohol carburante a partir de la caña de azúcar, pues éstos no ofrecen la glucosa en el primer paso, es indispensable abrir el abanico de posibilidades ante una realidad cambiante que

<sup>7</sup> ZALDIVAR, J; ROCA, C; LE FOLL, C; OLSSON, L. Ethanolic fermentation of acid pre-treated starch industry effluents by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains [en línea]. Bioresource Technology 96, 2005. [consultado 25 de oct, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.sciencedirect.com>.

propone necesidades y demanda soluciones, sobre todo ante la escasez y los altos precios de los combustibles fósiles, que igualmente no son renovables.

A su vez, la incorporación de nuevos cultivos, incorporarían las poblaciones rurales al desarrollo integral, a través de la producción a gran escala. Así mismo, se mejoraría la salud de la población e incrementaría la calidad del ambiente, pudiendo beneficiar social y económicamente a la población rural mediante el empleo, una vez que se inicie la implantación de la infraestructura industrial requerida para su producción nacional.

Con este proyecto se busca adquirir el conocimiento básico para desarrollar a futuro otros proyectos que involucren desarrollos tecnológicos, que hagan más favorable desde el punto de vista económico y técnico la obtención de alcoholes a partir de almidón de yuca. El impacto de este desarrollo tecnológico, consistente en la definición de pasos y tiempos de producción a escala de laboratorio del agroenergético, se sustenta en la pertinencia energética, pues vislumbra una nueva opción de producción del recurso renovable en el país, diferente al de la caña de azúcar. Los objetivos contemplados en este proyecto son los siguientes:

**OBJETIVO GENERAL:** Definir el proceso y las variables que más influyen a escala de laboratorio para la producción de etanol a partir de almidón de yuca.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ❖ Identificar las variables de operación que influyen en forma significativa en la producción de etanol a partir de almidón de yuca, tanto en la etapa de gelatinización como en la de hidrólisis enzimática.
- ❖ Efectuar un análisis del proceso, con el fin de sugerir nuevas modalidades de producción de etanol a partir de almidón de yuca.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. GENERALIDADES DEL ALMIDÓN

El almidón ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>x</sub> es un hidrato de carbono complejo. Se encuentra presente en muchas células vegetales como sustancia de reserva energética, en forma de gránulos microscópicos, constituidos por capas concéntricas, situados sobre todo en semillas, frutos, raíces y en los tubérculos. Es uno de los polisacáridos más importantes con peso molecular elevado, formado por la unión de estructuras moleculares de amilosa y amilopectina, que se pueden separar mediante agua caliente<sup>8</sup> (Figura 2).

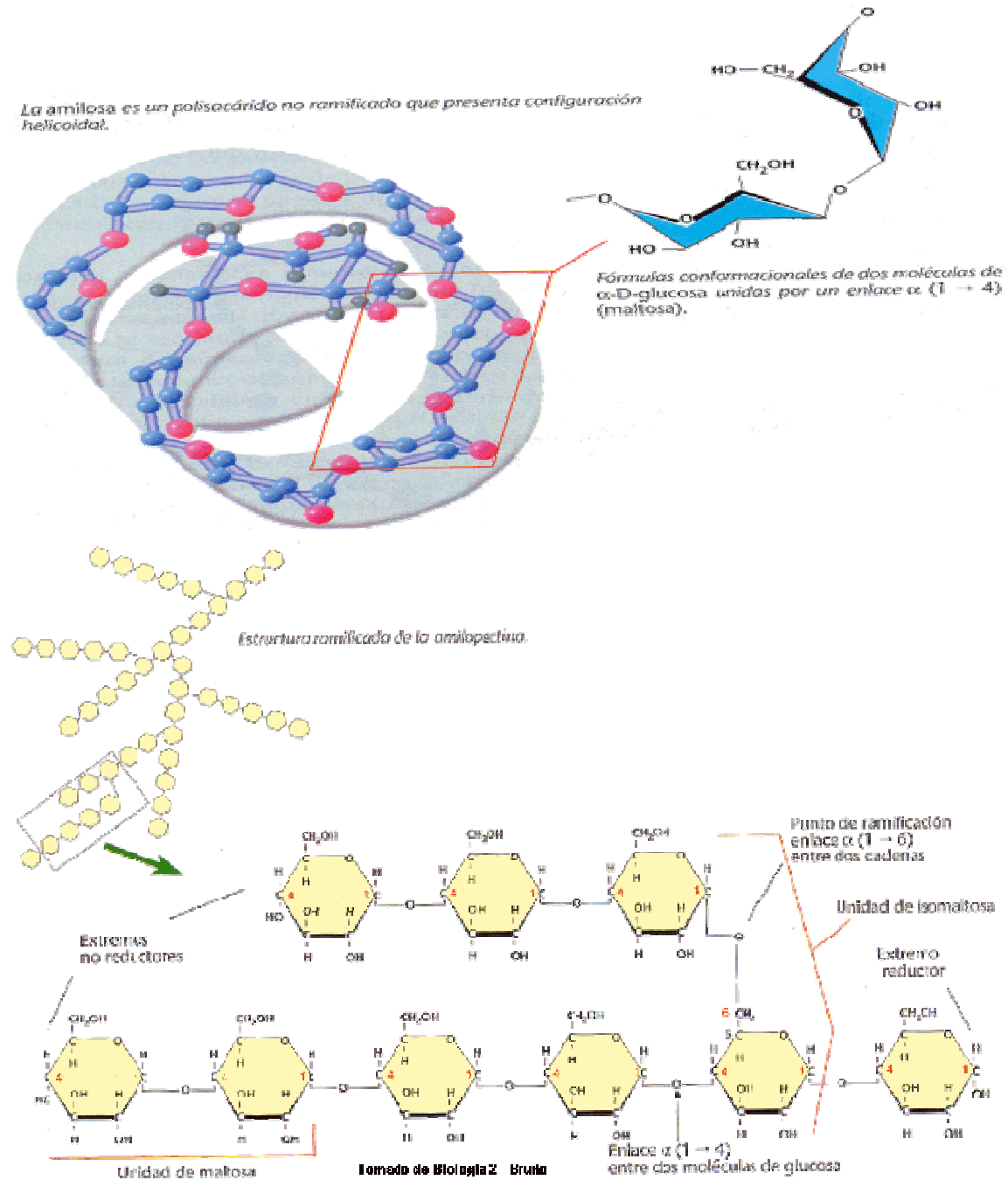
Es un homopolisacárido lineal formado por unas 200-2500 moléculas de D-glucosa, unidas entre si por enlaces  $\alpha$ -1,4 – glucosídicos. Es la parte soluble y tiene un peso molecular entre 30.000 y 50.000 uma. Tiene la facilidad de adquirir una conformación tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de hélice consta de seis moléculas de glucosa. El interior de la hélice contiene sólo átomos de hidrógeno, y es por tanto lipofílico, mientras que los grupos hidroxilo están situados, en el exterior de la hélice<sup>9</sup>.

---

<sup>8</sup> Gran enciclopedia Espasa, El Almidón. Tomo 1 de 20. Madrid: Espasa Calpe S.A., 2005. p. 506-509.

<sup>9</sup> Starch [en línea]. Londres: London South Bank University, 2005. [Consultado 01 de dic, 2005]. Disponible en Internet: <http://lsbu.ac.uk/water/starch.com>

**Figura 2.** Estructura de la amilosa y la amilopectina



Fuente: Polisacáridos [en línea]. Santiago de Cali: Untitled, 2005. [Consultado 31 de oct, 2005].

Disponible en <http://www.aulavirtualdebiologia.com>

La amilopectina es la parte insoluble y se encuentra en los almidones entre un 70 y un 85%. Es un homopolisacárido altamente ramificado, formado por más de 1.000 moléculas de glucosa unidas entre sí por enlaces  $\alpha$ -1,4 que le dan una forma molecular a la de un árbol; las ramas están unidas al tronco central (semejante a la amilosa) por enlaces  $\alpha$  – D – (1,6), localizados cada 15 – 25 unidades lineales de glucosa<sup>10</sup>. Su peso molecular es del orden de 30.000 uma. Este homopolisacárido es el responsable de la formación del engrudo de almidón.

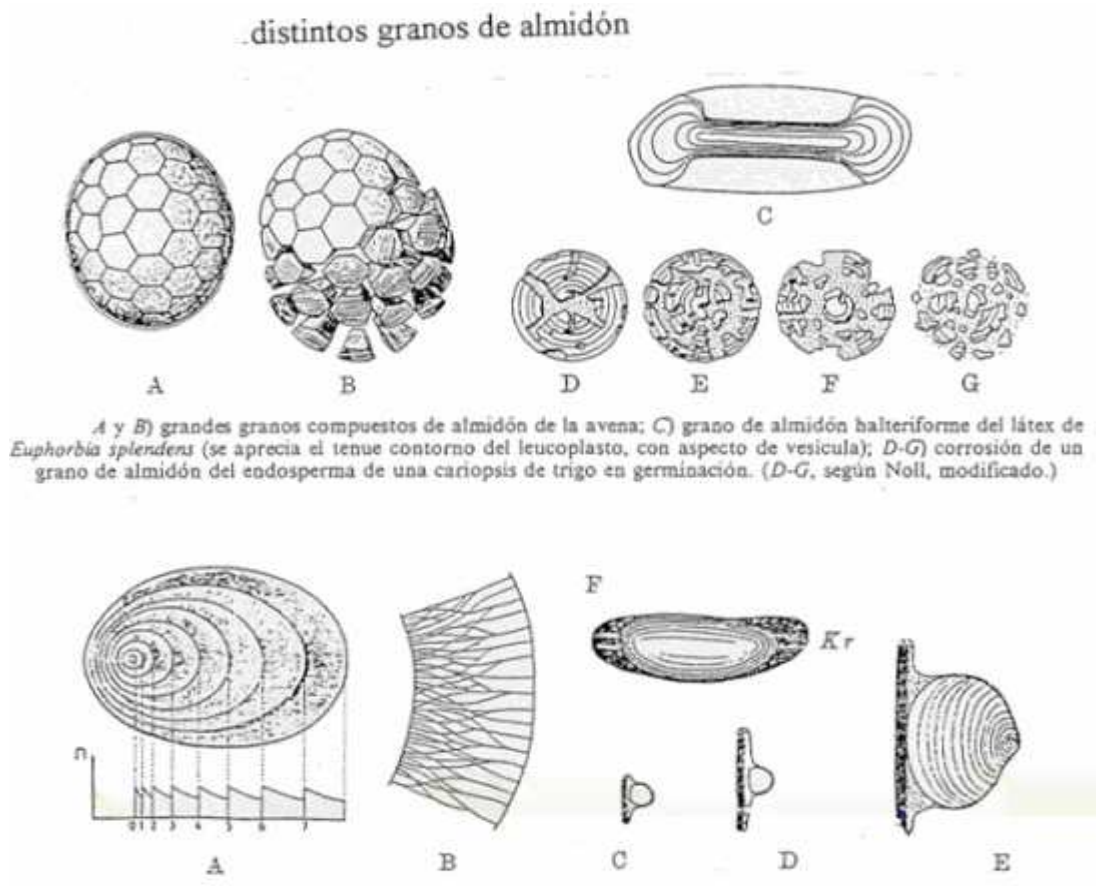
El almidón es fabricado por las plantas verdes durante la fotosíntesis. Forma parte de las paredes celulares de las plantas y de las fibras de las plantas rígidas. Los gránulos de almidón de las plantas presentan un tamaño, forma y características específicos del tipo de planta en que se ha formado el almidón (Figura 3). En su hidrólisis intervienen dos enzimas: la  $\alpha$ -amilasa (rompe enlaces 1-4) y la  $\alpha$ -(1,6) glucosidasa que rompe las ramificaciones. Al final del proceso se libera glucosa<sup>11</sup>.

---

<sup>10</sup> Starch [en línea]. Londres: London South Bank University, 2005. [Consultado 01 de dic, 2005]. Disponible en Internet: <http://isbu.ac.uk/water/sarch.com>

<sup>11</sup> Fuente: Polisacáridos [en línea]. Santiago de Cali: Untitled, 2005. [Consultado 31 de oct, 2005]. Disponible en <http://www.aulavirtualdebiologia.com>

**Figura 3.** Estructura interna de un grano de almidón



Fuente: Polisacáridos [en línea]. Santiago de Cali: Untitled, 2005. [Consultado 31 de oct, 2005].  
 Disponible en <http://www.aulavirtualdebiologia.com>

**1.1.1. Propiedades fisicoquímicas de los almidones.** Según reportes de agroindustrial mandioca, la velocidad de hinchamiento y la solubilidad de los almidones de cereales se retrasa debido al porcentaje de lípidos presentes. En cuanto a las proteínas estas afectan el sabor, el olor y tienden a formar espuma. En la Tabla 3 se puede observar que las féculas de yuca y papa contienen bajos porcentajes de lípidos (cerca de 0.1%) y bajos porcentajes de proteínas (cerca de

0.1%) comparadas con los almidones de cereales, los cuales alcanzan el 1% en lípidos y el 0.7% en proteínas, por lo tanto los almidones de yuca y papa manejan mejores velocidades de hinchamiento, solubilización y mejores condiciones de sabor, olor y baja producción de espuma, haciéndolos económicamente más eficientes<sup>12</sup>.

**Tabla 3.** Composición química de los almidones más comunes

Almidón	% Humedad	% Lípidos (b.s.)	% Proteínas (b.s.)	% Fósforo (b.s.)	Sabor y Olor
Yuca	13	0.1	0.1	0.01	Neutro
Papa	19	0.1	0.1	0.08	Bajo
Trigo	13	0.9	0.4	0.06	Alto
Maíz	13	0.8	0.35	0.02	Alto

Fuente: El almidón [en línea]. Bogotá: [Agroindustrial Mandioca, C.A.](http://www.mandioca.com), 1998. [Consultado 20 oct, 2005]. Disponible por Internet: <http://www.mandioca.com>.ve

La viscosidad refleja la consistencia de la pasta y las propiedades bajo calentamiento y enfriamiento en un tiempo determinado. En la Tabla 4 se observa que las féculas de yuca y papa, se hinchan de forma rápida a una baja temperatura; igualmente su pico de viscosidad es alto. El pico de viscosidad de los almidones de maíz y de trigo son relativamente bajos, porque los gránulos son hinchados moderadamente y requieren temperaturas más altas.

---

<sup>12</sup> El almidón [en línea]. Bogotá: [Agroindustrial Mandioca, C.A.](http://www.mandioca.com), 1998. [Consultado 20 oct, 2005]. Disponible por Internet: <http://www.mandioca.com>.ve

**Tabla 4.** Viscosidad de algunos almidones

Almidón	Temperatura de gel. °C	Rango pico viscosidad (cP)
Yuca	54-68	800-1500
Papa	56-66	1000-2500
Maíz	70-80	300-600
Trigo	75-85	200-500

Fuente: El almidón [en línea]. Bogotá: [Agroindustrial Mandioca, C.A.](http://www.mandioca.com), 1998. [Consultado 20 oct, 2005]. Disponible por Internet: <http://www.mandioca.com>.ve

**1.1.2. Aplicaciones del almidón.** Entre las principales funciones del almidón están las que cumplen en el organismo como fuente energética alimenticia y en la industria, en la fabricación de alimentos y en otros campos como energético base para la producción de biocombustibles.

Hay una variedad de productos que pueden ser obtenidos de la biomasa del almidón vía hidrólisis. El alcohol es uno de los productos que pueden obtenerse en más alto volumen. Recientemente ha habido investigaciones enfocadas al incremento en la producción de etanol utilizando enzimas y microorganismos inmovilizados (Ratnam *et al.*, 2005).

Para obtener etanol a partir de almidón es necesario romper las cadenas de este polisacárido adicionando una etapa de hidrólisis para obtener jarabe de glucosa, el



cual se puede convertir en etanol mediante las levaduras. Por tanto podemos identificar las siguientes etapas<sup>13</sup>:

- ❖ Gelatinización.
- ❖ Hidrólisis Enzimática.
- ❖ Fermentación Alcohólica.
- ❖ Destilación.

**1.1.3. El almidón de yuca y otros almidones.** El almidón de yuca se conoce en Brasil como Tapioca y por sus características lo hacen uno de los productos de mayor aplicación en la industria alimenticia como ligante de agua, en emulsificantes, fuente de carbohidratos, espesante y agente texturizante comparado con otros almidones como el de papa, arroz y maíz. Es un polvo fino de color blanco, con aproximadamente un 13% de humedad como máximo y un pH cercano a 6. El almidón natural necesita de la aplicación de calor para que se hidrate. El grado de hidratación depende principalmente del pH, de la temperatura y el tiempo<sup>14</sup>.

Los almidones de cereales requieren procesos industriales más tecnificados que los almidones de raíces y tubérculos, ya que estos últimos pueden realizarse con tecnologías más sencillas y fáciles de obtener en el medio rural. Los gránulos del almidón de papa y yuca contienen un pequeño porcentaje de sustancias grasas comparadas con los almidones de cereales como el maíz y el arroz. Esta baja composición favorece al almidón de yuca (Tabla 3), ya que si se tiene una mas

---

<sup>13</sup> Almidón [en línea]. De Wikipedia, la enciclopedia libre, 2005. [Consultado 20 de oct, 2005]. Disponible en Internet: <http://es.wikipedia.org/wiki/Almidón>

<sup>14</sup> Extracción de almidón de yuca. Manejo integral y control de la contaminación hídrica [en línea]. ValleUniversity. Engineering Faculty, 2005. [Consultado 11 de nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://patolozunivalle.edu.co>

alta composición, se forman más complejos amilosa-lípido dentro de la hélice, que tienden a reprimir el hinchamiento y la solubilización de los gránulos de almidón, lo que conlleva a que se necesiten temperaturas altas ( $>125\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para romper este tipo de estructuras y favorecer la solubilización de la amilosa.

Dependiendo del tipo de almidón, la cantidad de amilosa se encuentra en un rango entre el 15 y el 25% (Tabla 5). En promedio el contenido de amilosa en el almidón de yuca es del orden del 17% (Ceballos y de la Cruz, 2004). Cuanto más bajo es el porcentaje de amilosa, el almidón es más estable y resistente a la retrogradación (reorganización de la amilosa y amilopectina en una estructura cristalina cuando las pastas de los almidones son enfriados). El almidón de yuca tiene una tendencia baja a la retrogradación y produce un gel muy claro y estable. La retrogradación se atribuye a la insolubilización espontánea del almidón en soluciones acuosas debido a la tendencia de los polímeros del almidón a enlazar hidrógenos. La fracción de amilosa se retrograda rápidamente debido a su habilidad para formar enlaces de hidrógeno intermoleculares; las fracciones ramificadas muestran mucho menos tendencias a formar enlaces de hidrógeno y por lo tanto se retrogradan menos.

**Tabla 5.** Contenido de Amilosa en los almidones más comunes

Tipo de Almidón	% de Amilosa
Maíz	24 a 36
Trigo	17 a 29
Arroz	8 a 37
Papa	18 a 23
Yuca	16 a 19

Fuente: El almidón [en línea]. Bogotá: [Agroindustrial Mandioca, C.A.](http://www.mandioca.com), 1998. [Consultado 20 oct, 2005]. Disponible por Internet: <http://www.mandioca.com>.ve

## 1.2. GELATINIZACIÓN

Los gránulos de almidón cuando se calientan en agua, sufren el proceso denominado gelatinización, que es el rompimiento de la ordenación de las moléculas en los gránulos produciendo la lixiviación de la amilosa.

Los gránulos de almidón son insolubles en agua hasta cerca de los 55 ° C, luego absorben agua y se hinchan, aumentando varias veces su tamaño hasta una cierta temperatura crítica, donde ocurre el fenómeno de la gelatinización. La temperatura crítica a la cual ocurre este fenómeno es conocida como grado de gelatinización. Dependiendo del tipo de almidón la temperatura de gelatinización puede estar entre los 55 a 80° C<sup>15</sup> (Tabla 5).

En el caso concreto de los almidones de yuca, estos se hinchan rápidamente a bajas temperaturas 60 – 68°C (Tabla 6) dando pastas claras, de sabor suave, adhesivas, fibrosas (Whistler, 1984) y poco estables a altas temperaturas (90°C). El almidón de yuca necesita de la aplicación de calor para que se hidrate y cuando se enfría puede formar un gel débil. Cuando se hidrata y se dispersa en agua caliente, alcanza el pico máximo rápidamente, lo que implica menos energía durante la producción de gel (Ceballos y de la Cruz, 2004). El almidón de yuca ofrece mayores oportunidades de comercialización, ya que en algunos casos la modificación química a realizar es más sencilla y menos costosa cuando se

---

<sup>15</sup> Almidón [en línea]. De Wikipedia, la enciclopedia libre, 2005. [Consultado 20 de oct, 2005]. Disponible en Internet: <http://es.wikipedia.org/wiki/Almidón>

efectúa a partir de este almidón que partiendo de otros como el de maíz o de papa<sup>16</sup>.

Los gránulos de almidón de yuca, al igual que el resto de almidones, son insolubles en agua fría, pero pueden hincharse ligeramente con el agua y volver luego al tamaño original.

**Tabla 6.** Temperatura de Gelatinización de algunos almidones

Tipo almidón	% amilosa	Temperatura gelatinización °c
Maíz	27	72
Trigo	24	68
Papa	16-28	68
Yuca	13-15	62-68

Fuente: Almidón [en línea]. De Wikipedia, la enciclopedia libre, 2005. [Consultado 20 de oct, 2005]. Disponible en Internet: <http://es.wikipedia.org/wiki/Almid%C3%B3n>

---

<sup>16</sup> Extracción de almidón de yuca. Manejo integral y control de la contaminación hídrica [en línea]. ValleUniversity. Engineering Faculty, 2005. [Consultado 11 de nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://patolozunivalle.edu.co>

**1.2.1. Etapas de la Gelatinización.** Cuando el almidón se encuentra en una suspensión acuosa y se inicia el calentamiento, los gránulos suelen hincharse progresivamente hasta que gelatinizan, pierden su poder de birrefringencia, se desintegran y forman una pasta según el origen y la concentración del almidón.

En resumen el rompimiento de la estructura del almidón por calentamiento en agua se asume en tres etapas<sup>17</sup>:

- ❖ En la primera, se produce una absorción de agua en forma lenta y reversible a la vez que se produce un ligero hinchamiento de los gránulos, la viscosidad no aumenta notoriamente y el gránulo retiene su apariencia y birrefringencia.
- ❖ La segunda etapa se basa en el hinchamiento notorio del gránulo, incrementándose rápidamente la viscosidad de la suspensión, los gránulos se alteran, varían en su aspecto interno y pierden su estructura y birrefringencia.
- ❖ Durante la tercera etapa de hinchamiento, los gránulos se transforman en sacos deformados (Kerr, 1950)

Los diversos estados de gelatinización pueden ser observados en un microscopio de polarización. Estos estados son: la temperatura de iniciación (primera observación de la pérdida de birrefringencia), la temperatura media, la temperatura final de la pérdida de birrefringencia (temperatura a la cual el último gránulo en el campo de observación pierde su birrefringencia). El intervalo de temperatura de gelatinización se define entre los estados inicial y final de pérdida de birrefringencia.

---

<sup>17</sup> Production of alcohol from raw wheat flour by amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae* [en línea]. Enzyme and microbial technology, 2000. [Consultado 15 de oct, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.sciencedirect.com>.

Al finalizar este fenómeno, se genera una pasta en la que existen cadenas de amilosa de bajo peso molecular altamente hidratadas que rodean a los agregados, también hidratados, de los restos de los gránulos.

### 1.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis es el rompimiento o degradación de un biopolímero. Se estima que de cada 100 g de almidón se pueden obtener teóricamente 111 g de glucosa, lo que implica una relación estequiométrica de 9:10.<sup>18</sup>

Para realizar la hidrólisis del almidón, se requiere básicamente de dos pasos:

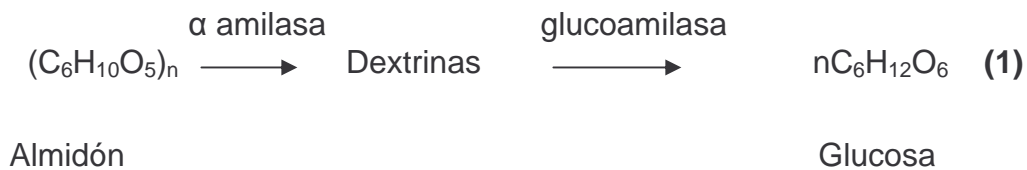
- ❖ Solubilización o gelatinización del almidón por calentamiento.
- ❖ Hidrólisis enzimática o licuefacción

La figura 4 nos muestra que para la hidrólisis del almidón se usa  $\alpha$ -amilasa obtenida de bacterias termoresistentes como la *Bacillus licheniformis* o *B. amyloliquefaciens*, ideal para la primera etapa de la hidrólisis de las suspensiones de almidón que tienen que ser llevadas a altas temperaturas (90°-110° C) para el rompimiento de los gránulos de almidón, condición necesaria para el tratamiento enzimático. El producto de esta etapa de licuefacción es una solución de almidón que contiene dextrinas (oligosacaráridos compuestos por varias unidades de glucosa) y pequeñas cantidades de glucosa. El almidón licuado se somete a sacarificación a menores temperaturas (60°-70° C) con glucoamilasa la cual

---

<sup>18</sup> De qué está compuesto el almidón [en línea]. Enzyme and microbial technology, 2000. [Consultado 24 nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php>.

hidroliza las dextrinas hasta glucosa, lo anterior se representa en la ecuación (1) (Nigam y Singh, 1995).



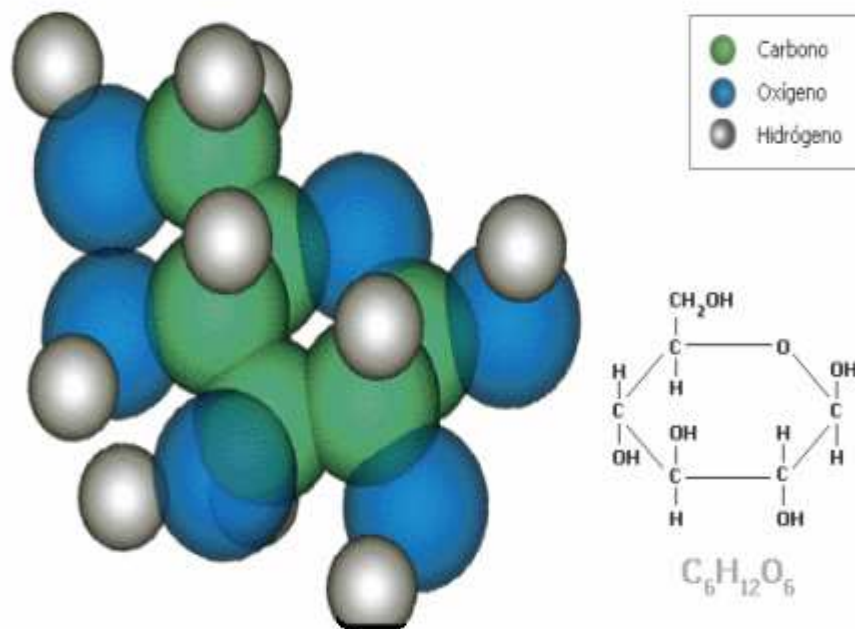
**Figura 4. Hidrólisis del Almidón**

<b>HIDROLISIS DEL ALMIDON</b>		
<b>Composicion</b>	amilosa (uniones glu $\alpha$ 1-4)	<i>proporcion variable</i>
	amilopectina (uniones glu $\alpha$ 1-6)	<i>según tipo de grano</i>
<b>Tipo de hidrolisis</b>	química :calentamiento en medio acido enzimatica	
<b>Enzimas</b>	<b><math>\alpha</math>-amilasa</b> :1 $\alpha$ -4(endo) glucosidasa	<b>Producto</b> <i>dextrinas</i>
	<b>glucoamilasa</b> :1 $\alpha$ -4(exo) glucosidasa y (1 $\alpha$ -6) en mucha menor proporcion	<i>glucosa</i>

Fuente: Enzimas microbianas de uso industrial [en línea]. Enzyme and microbial technology, 2000. [Consultado 24 nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php>.

La glucosa, de fórmula  $C_6H_{12}O_6$ , es un azúcar simple o monosacárido, que es empleado por la levadura en la fermentación alcohólica para la producción de etanol. Su molécula puede presentar una estructura lineal o cíclica; esta última, representada en la ilustración, es termodinámicamente más estable (Figura 5).

**Figura 5. Molécula de glucosa**



Fuente: Molécula de glucosa [en línea]. México: ELSERVIER, 1998. [Consultado 20 de dic, 2005].  
Disponible en Internet: <http://www.foros.bob.mx/read.php>



El método convencional de hidrólisis de almidón utilizando ácido, ha sido reemplazado por procesos de sacarificación de enzimas que son obtenidas tradicionalmente en cultivos tratados con control de factores ambientales tales como la temperatura y el pH (Kunamneni y Singh, 2005). Entre las enzimas más importantes en el proceso de sacarificación del almidón se encuentran la  $\alpha$ -amilasas,  $\beta$ -amilasas, glucoamilasas, glucosa isomerasa, pululanasa e isoamilasa (Crueger y Crueger, 1989; Ospina, 2001).

**1.3.1. Las  $\alpha$ -amilasas.** Las  $\alpha$ -amilasas (1,4- $\alpha$ -Glucan-glucanohidrolasas) son enzimas extracelulares que se encargan de hidrolizar los enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídicos, tienen un peso molecular aproximado de 50Kda y sus condiciones óptimas de trabajo son a una temperatura de 90°C y pH neutro. Son endoenzimas, que rompen el sustrato dentro de la molécula. Su acción no es inhibida por los enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos aunque éstos no sean rotos en el proceso de hidrólisis. Las  $\alpha$ -amilasas son producidas por muchas bacterias y hongos. Muchos organismos producen varias  $\alpha$ -amilasas, entre ellos tenemos: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus polymixa*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, etc. (Crueger y Crueger, 1989). Entre las aplicaciones más importantes de las  $\alpha$ -amilasas tenemos<sup>19</sup>:

---

<sup>19</sup> VARGAS APAZA, Luís. Selección y evaluación de bacterias del género *Bacillus* productoras de amilasa en cultivo sumergido. Lima, 2002. 79p. Trabajo de grado (Biotecnólogo). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Escuela de Post-Grado.

- ❖ La licuefacción del almidón para producir edulcorantes como glucosa, fructosa y maltosa
- ❖ La modificación de harina deficiente en  $\alpha$ -amilasa
- ❖ El mejoramiento de filtrabilidad del jugo de caña de azúcar y entre otras aplicaciones (Crueger y Crueger, 1989).

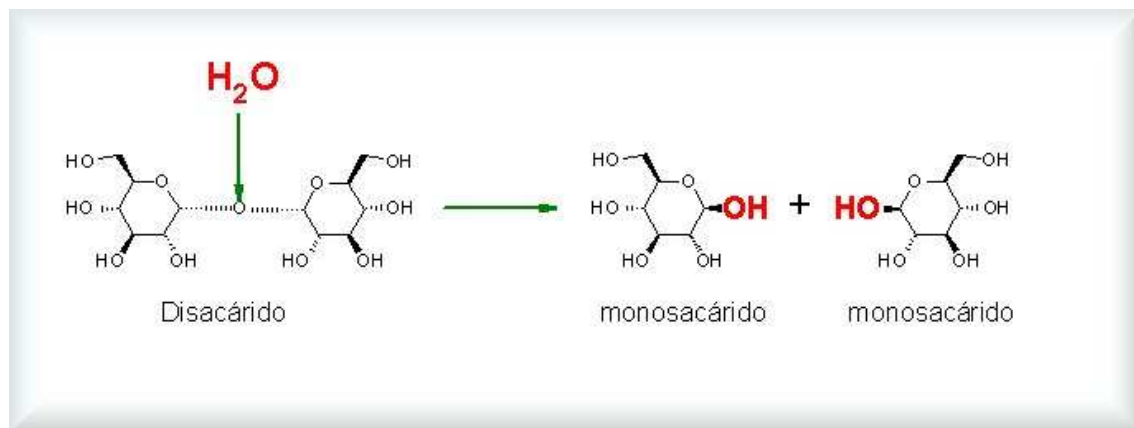
Las propiedades y mecanismos de acción de la  $\alpha$ -amilasa dependen del origen de las enzimas, todas ellas son endo enzimas. La hidrólisis de los enlaces glicosídicos  $\alpha$ -(1,4) entre la ramificaciones  $\alpha$ -(1,6) de la amilopectina por la  $\alpha$ -amilasa, también rinde glucosa y maltosa además de una serie de  $\alpha$ -dextrina límite (que es un núcleo grande y muy ramificado como producto final de la acción exhaustiva de la amilasa), lo que conduce a una liquefacción del almidón después de una rápida gelatinización, por lo que la  $\alpha$ -amilasa se le conoce como enzima “licuante”; estas dextrinas de cuatro o más residuos de glucosa contienen todas enlaces  $\alpha$ -(1,6) glicosídicos de la estructura original.

La hidrólisis de un enlace glucosídico se lleva a cabo mediante la disociación de una molécula de agua del medio. El hidrógeno del agua se une al oxígeno del extremo de una de las moléculas de azúcar; el OH se une al carbono libre del otro residuo de azúcar. El resultado de esta reacción, es la liberación de un monosacárido o un disacárido si se trataba de un polisacárido más complejo (Figura 6).

Con la amilopectina o glucógeno (Figura 7), en la segunda etapa de la degradación del almidón por la  $\alpha$ -amilasa, involucra baja hidrólisis de maltotriosa, así como baja hidrólisis de enlaces específicos cerca de los puntos de ramificación de las  $\alpha$ -dextrina límite (Whelan, 1960; Umeki y Yamamoto, 1975; Richard, 1989). Los enlaces  $\alpha$ -(1,6) son resistentes a la  $\alpha$ -amilasas y ellas le confieren alguna estabilidad a los enlaces  $\alpha$ -(1,4) cerca de los puntos de ramificación, la formación

del complejo enzimasustrato parece ser restringido por la presencia de estos enlaces  $\alpha$ -(1,6) (Manners y Marshall, 1971)<sup>20</sup>. Las  $\alpha$ -amilasas son generalmente estable a pH 5.5 – 8.0 (Maning y Campbell, 1961). La temperatura a la que actúan, las amilasas se pueden clasificar en amilasas termoestables y termolábiles; las enzimas termoestables son las que actúan sin perder su actividad en un rango 60 - 110°C y la mayoría de ellas son de origen bacteriano, mientras que las termolábiles son aquellas que actúan hasta 55°C sin perder su actividad, generalmente varía 20 – 55°C y son de origen fúngico principalmente (Wiseman, 1986)<sup>21</sup>.

**Figura 6.** Representación de la hidrólisis de un polisacárido, en este caso un disacárido

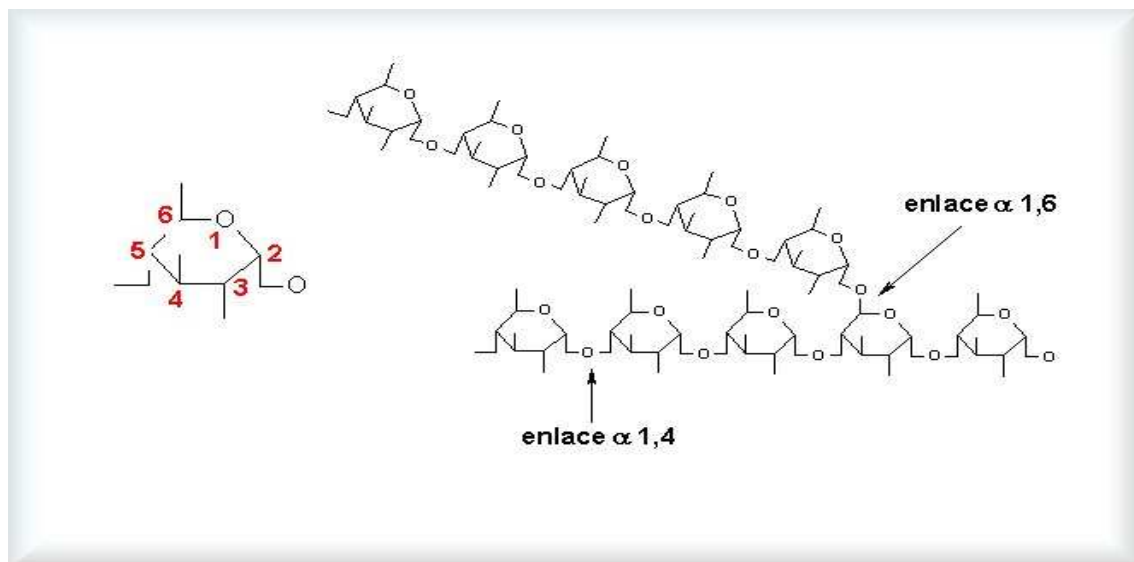


Fuente: Hidrólisis de un polisacárido [en línea]. México: Instituto de Química UNAM, 2003. [Consultado 18 de nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://bq.unam.mx/~evazquez>

<sup>20</sup> VARGAS APAZA, Luís. Selección y evaluación de bacterias del género *Bacillus* productoras de amilasa en cultivo sumergido. Lima, 2002. 79p. Trabajo de grado (Biotecnólogo). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Escuela de Post-Grado.

<sup>21</sup> Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch by co-immobilized amyloglucosidase and cells of *Zymomonas mobilis* using response surface methodology [en línea]. USA: Enzyme and microbial technology, 2005. [Consultado 05 de oct, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.sciencedirect.com>

**Figura 7.** Representación de la estructura del glucógeno



Fuente: Hidrólisis de un polisacárido [en línea]. México: Instituto de Química UNAM, 2003. [Consultado 18 de nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://bq.unam.mx/~evazquez>

**1.3.2. Las  $\beta$ -amilasas.** Las  $\beta$ -amilasas ( $\alpha$ - 1,4- Glucan- maltohidrolasas) son usualmente originadas en plantas, pero algunas son producidas por microorganismos entre ellos tenemos: *Bacillus polymixia*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Streptomyces sp*, *Pseudomonas sp*, y *Rhizopus japonicus*. Aunque su producción en estado silvestre es usualmente baja, se ha descubierto que algunas mutaciones producen 200 veces más enzimas que las silvestres del mismo tipo. Las  $\beta$ -amilasas bacteriales resisten más altas temperaturas ( $>70^{\circ}\text{C}$ ) que las  $\beta$ -amilasas producidas por plantas y el pH óptimo es, además, alto (cerca de 7.0). En contraste con la  $\alpha$ -amilasa, no es necesario calcio para estabilizar y activar la bacteria que produce la  $\beta$ -amilasa. En el futuro pueden ser usadas las  $\beta$ -amilasas para la producción de jarabes de Maltosa (Crueger y Crueger, 1989). A nivel mundial las investigaciones sobre amilasas estuvieron ligadas al desarrollo de la industria del almidón; el desarrollo de estas investigaciones perfeccionó la

producción de estas enzimas llegando a ser un importante renglón en la economía de las empresas productoras de enzimas. A nivel nacional y regional las investigaciones sobre amilasas se dedicaron sólo a su aplicabilidad, producción de jarabes glucosados, actualmente universidades como la de Antioquia y la Nacional están llevando a cabo investigaciones para la obtención de jarabes glucosados con el apoyo de Conciencias<sup>22</sup>.

**1.3.3. Las Glucoamilasas.** Son de origen fúngico (*Aspergillus Níger* y *Rhizopus niveus*). Estas enzimas se producen como isoenzimas cuyo perfil varía con la composición del medio y modo de producción. Se utilizan para producir glucosa, maltosa y dextrinas. Hidroliza uniones  $\alpha$ -1-4 y  $\alpha$ -1-6, pero estas últimas lo hace de forma más lenta.<sup>23</sup>

## 1.4. FERMENTACIÓN.

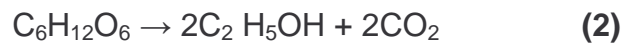
La fermentación se define como los cambios químicos en las sustancias orgánicas complejas, que se descomponen en otras más simples por la acción de las enzimas. Esta definición general incluye prácticamente todas las reacciones químicas de importancia fisiológica. Actualmente, los científicos suelen reservar dicha denominación para la acción de ciertas enzimas específicas, llamadas fermentos, producidas por organismos tales como hongos, bacterias y levaduras. El tipo de fermentación más importante es la fermentación alcohólica, en donde se

---

<sup>22</sup> Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of Maite starch for higher glucosa production [en línea]. South Africa: Biochemical Engineering Journal, 2005. [consultado 20 nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.elsevier.com/locate/bej>.

<sup>23</sup> Enzimas de Interés Industrial [en línea]. Bogotá: Universidad Nacional, 2005. [Consultado 25 nov, 2005]. Disponible en Internet: [http://www.biogestion.unal.edu.co/proyecto\\_10.htm](http://www.biogestion.unal.edu.co/proyecto_10.htm)

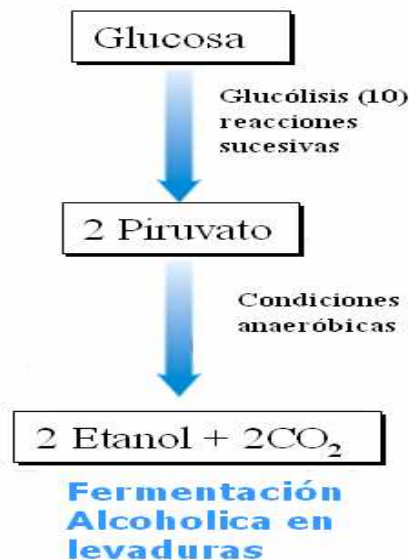
busca que la levadura convierta los azúcares simples, como la glucosa y la fructosa, en alcohol etílico y dióxido de carbono. La reacción de la fermentación alcohólica es representada por la ecuación (2):



Hay otros tipos de fermentación que se producen de forma natural, como la formación de ácido butanoico cuando la mantequilla se vuelve rancia, y de ácido etanoico (acético) cuando el vino se convierte en vinagre.

**1.4.1. Producción de Etanol en la Fermentación.** El esquema general del proceso de producción de etanol se representa en la Figura 8.

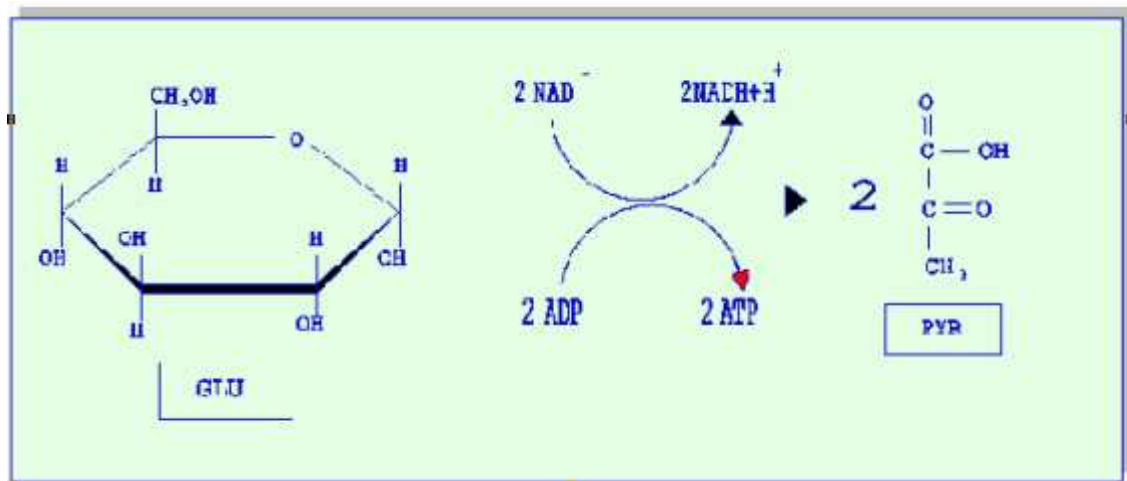
**Figura 8.** Proceso de producción de Etanol vía la fermentación alcohólica



Fuente: Metabolismo [en línea]. ITSM, 2005. [consultado 02 de feb, 2006]. Disponible en Internet: [http://www.respiracion\\_celular/MC.PedroAyala.com](http://www.respiracion_celular/MC.PedroAyala.com)

**1.4.1.1. Glucólisis.** La glucólisis consiste en una secuencia de 10 reacciones enzimáticas que degradan la glucosa ( $C_6$ ) transformándola en dos moléculas de piruvato ( $C_3$ ). Es un proceso anaerobio, en el cual por mol de glucosa, se producen dos moles de ATP (Adenosín Trifosfato) y dos de NADH (Nicotin Adenin dinucleótido). Se trata de la ruta metabólica mejor conocida, desempeñando un papel clave en el metabolismo energético al proporcionar una parte importante de la energía utilizada por la mayoría de los organismos. Su función principal es preparar la glucosa y otros carbohidratos para su posterior degradación oxidativa<sup>24</sup>. Las 10 reacciones enzimáticas constituyentes de la glucólisis se recogen esquemáticamente en la Figura 9.

**Figura 9.** Representación de la glucólisis



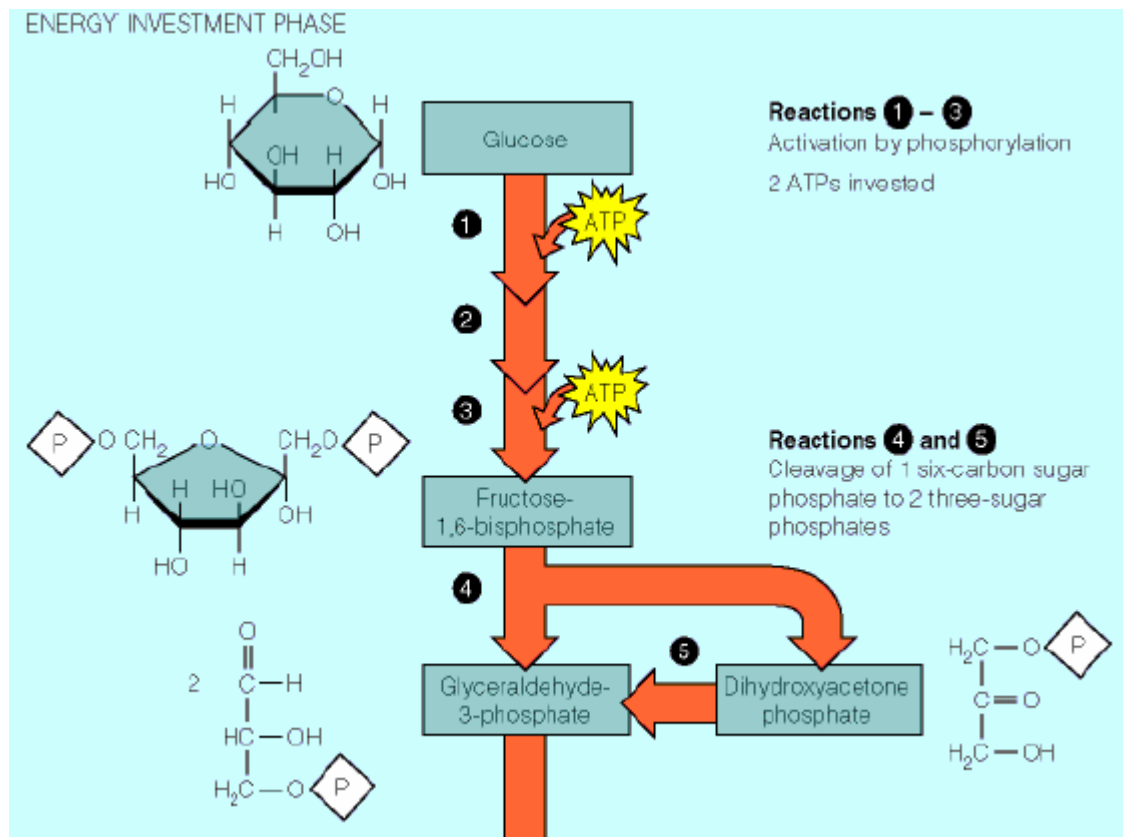
Fuente: Vías del Catabolismo [en línea]. Educastur, 2004. [consultado 02 de dic, 2005]. Disponible en Internet: [http://web.educastur.princast.es/proyectos/biogeo\\_ov/2BCH/B3\\_METABOLISMO/t33\\_RESPIRACION/informacion.htm](http://web.educastur.princast.es/proyectos/biogeo_ov/2BCH/B3_METABOLISMO/t33_RESPIRACION/informacion.htm)

<sup>24</sup> Vías del Catabolismo [en línea]. Educastur, 2004. [consultado 02 de dic, 2005]. Disponible en Internet: [http://web.educastur.princast.es/proyectos/biogeo\\_ov/2BCH/B3\\_METABOLISMO/t33\\_RESPIRACION/informacion.htm](http://web.educastur.princast.es/proyectos/biogeo_ov/2BCH/B3_METABOLISMO/t33_RESPIRACION/informacion.htm)

Al inicio de la vía se consume ATP para la generación de grupos fosforilo, pero posteriormente se regenera. Por tanto, la glucólisis transcurre en dos fases:

**Fase 1ª.** (Reacciones 1-5). Fase preparatoria en que la glucosa es fosforilada y fragmentada, dando lugar a dos moléculas de gliceraldehido-3-fosfato. Este proceso consume 2 ATPS (Figura 10).

**Figura 10.** Primera fase de la glucólisis

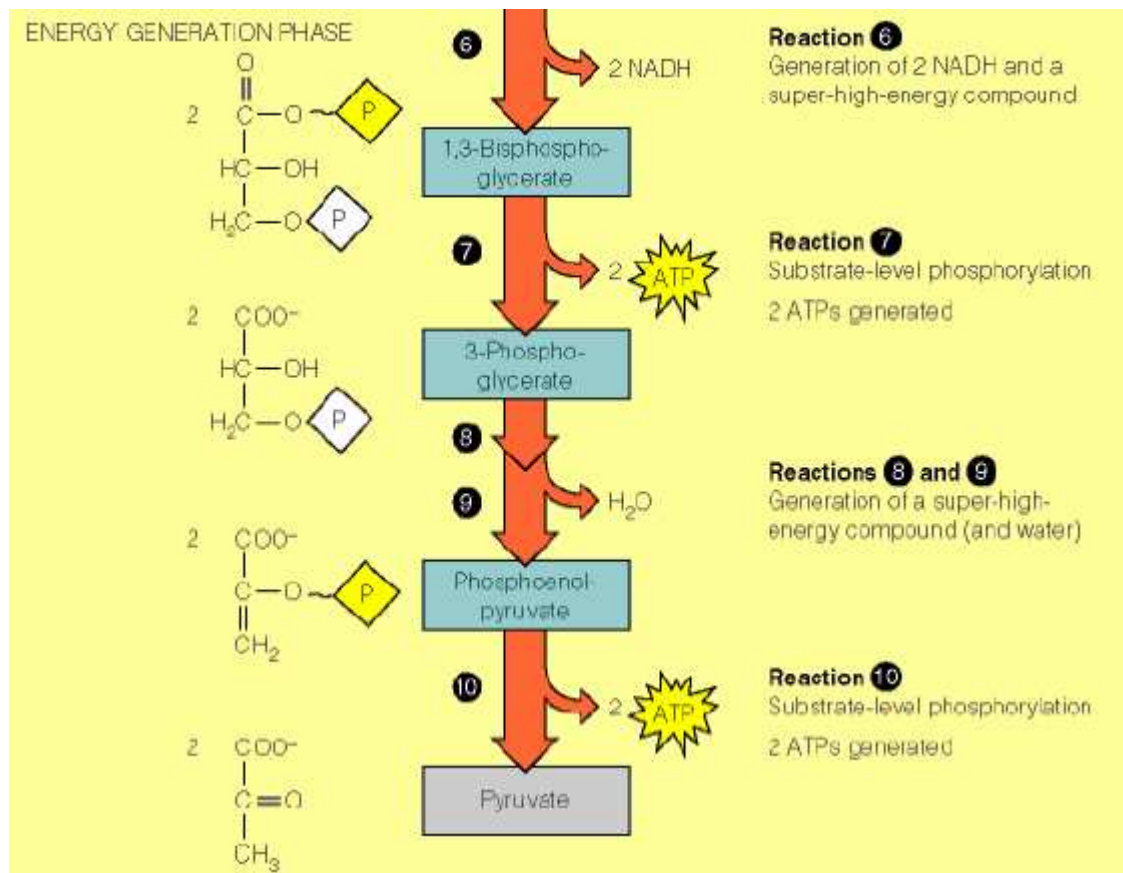


Fuente: Glucólisis [en línea]. USA: Mathews3eCh13, 2001. [consultado 15 de feb, 2006].  
 Disponible en Internet: <http://www.creces.cl/new/index.asp?imat=%20%203E%20%2013&tc=3&nc=5&art=66-78k->



**FASE 2<sup>a</sup>** (Reacciones 6-10). Las dos moléculas anteriormente formadas se convierten a dos moléculas de piruvato, con la producción de 4 ATPs. En la Figura 11 se representa esta segunda fase que llega a la degradación completa de la glucosa<sup>25</sup>.

**Figura 11.** Segunda fase de la glucólisis

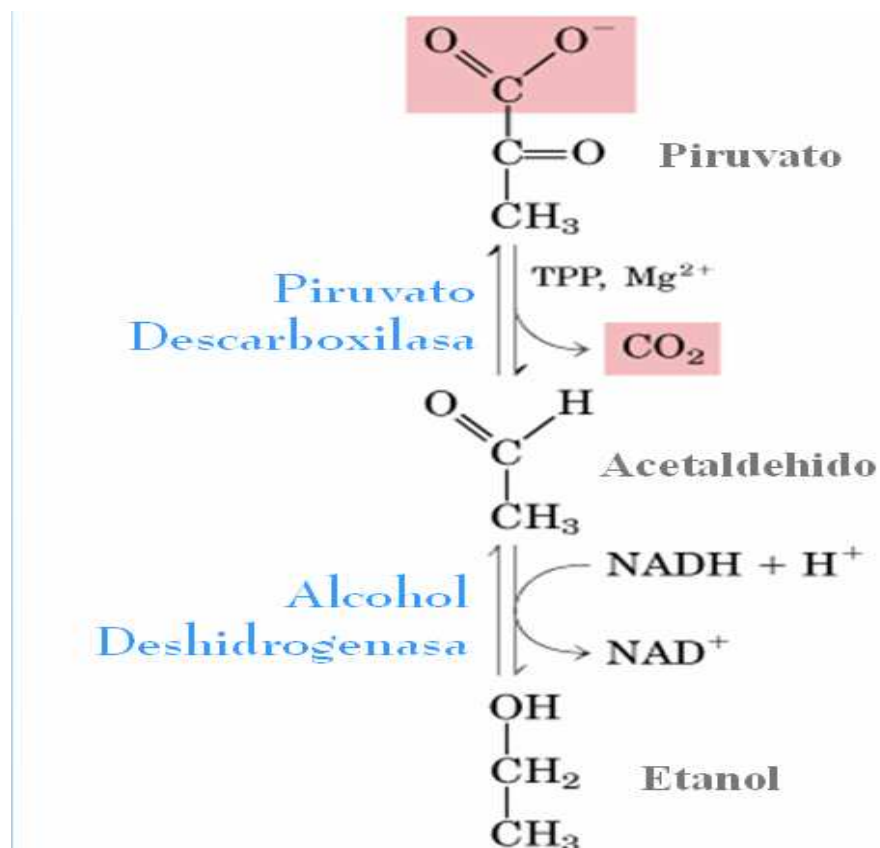


Fuente: Glucólisis [en línea]. USA: Mathews3eCh13, 2001. [consultado 15 de feb, 2006].  
 Disponible en Internet: <http://www.creces.cl/new/index.asp?imat=%20%203E%20%2013&tc=3&nc=5&art=66-78k->

<sup>25</sup> Metabolismo I [en línea]. Educatur, 2004. [consultado 12 de dic, 2005]. Disponible en internet: <http://www.monografias.com>

**1.4.1.2. Fermentación alcohólica.** El piruvato formado por degradación de la glucosa puede sufrir posteriormente distintas degradaciones, dependiendo de las condiciones y del organismo. En condiciones aeróbicas, el piruvato se oxida aun más a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, y posteriormente a través de la fosforilación oxidativa, generando  $\text{CO}_2$  y agua y en condiciones anaeróbicas, tiene lugar la fermentación homoláctica en la que el piruvato es reducido hasta lactato, o en la fermentación alcohólica con levaduras, en la que se reduce hasta etanol y  $\text{CO}_2$  (Figura 12)

**Figura 12.** Reacciones de la obtención de Etanol a partir del Piruvato

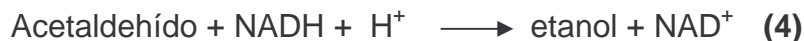


Fuente: Enzimas microbianas de uso industrial [en línea]. Enzyme and microbial technology, 2000. [Consultado 24 nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.scielo.org.velsciolo.php>.

De la figura anterior se deduce que la fermentación alcohólica transcurre por la misma ruta enzimática de la glucólisis, pero necesita dos etapas adicionales. En la primera parte, el átomo de carbono  $\alpha$  del piruvato es atacado por el pirofosfato de tiamina y experimenta una descarboxilación o sea, pérdida de  $\text{CO}_2$ ; la coenzima queda en la forma de 2-hidroxietil – derivado que puede considerarse una forma del acetaldehído activado o ligado a la coenzima, ecuación (3)

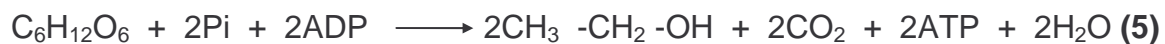


En la etapa final el acetaldehído se reduce a etanol y el potencial de reducción es proporcionado por el  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , en una reacción catalizada por el alcohol – deshidrogenasa reacción (4).



En la cadena respiratoria la oxidación del  $\text{NADH} + \text{H}^+$  y del  $\text{FADH}_2$  tiene como aceptor final de los electrones al oxígeno. De esta manera, el  $\text{NAD}^+$  se recupera y la glucólisis y el ciclo de Krebs pueden mantenerse. Si no hay oxígeno, el  $\text{NADH} + \text{H}^+$  y el  $\text{FADH}_2$  se acumulan y los procesos de obtención de energía se interrumpen. En estas condiciones anaeróbicas, ciertos microorganismos recuperan las coenzimas oxidadas por diversas vías metabólicas conocidas bajo el nombre de anaerobios estrictos.

Las reacciones de fermentación resultan completas en su visión del fenómeno cuando en las mismas se tiene en cuenta la formación de ATP a partir de fosfatos (reacción 5). En realidad, este proceso no puede ocurrir sin la simultánea fosforilación oxidativa del ADP.



La fermentación alcohólica tiene el objetivo de recuperar el  $\text{NAD}^+$  en condiciones anaeróbicas, transformando el ácido pirúvico en alcohol etílico o etanol<sup>26</sup>.

**1.4.1.3. Microorganismos utilizados en la fermentación alcohólica.** Las levaduras al igual que una larga serie de otros microorganismos, viven libres e independientes en la naturaleza, se encuentran en las frutas, los granos y otras materias nutritivas que contienen azúcares, en el suelo (especialmente en los viñedos y en los huertos, en el aire, en la piel y en el intestino de los animales).

Se diseminan por intermedio de portadores y por el viento, por lo general son organismos monocelulares y se presentan en formas muy variadas desde los esféricos, ovoides y elipsoidales.

Las levaduras son los microorganismos de mas vasto y antiguo empleo por el hombre con fines utilitarios, se usan en la industria de alcohol, vino, cerveza, en todo tipo de licores y en múltiples procesos que exigen fermentación o inversión de azúcares. Las levaduras son los microorganismos más utilizados en la producción de etanol por la vía fermentativa, debido a que producen un buen proceso de separación después de la fermentación, además producen un contenido de toxinas muy inferior a otros microorganismos (Pelayo, 1990). Ahora

---

<sup>26</sup> Obtención de fuentes alternativas de energía [en línea]. Bogotá: Fundación ecológica de Colombia, 2005. [consultado 24 de nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.fundacionecologicadecolombia.org/BIOETANOL%20SISTEMAS%20DE%20FERMENTACION.htm>

bien, el tipo de levadura a utilizar industrialmente debe reunir las siguientes condiciones<sup>27</sup>:

- ❖ Ser capaz de fermentar el mosto eficientemente, ya que los monosacáridos no son todos igualmente fermentables, por ejemplo, las hexosas (glucosa, fructosa y manosa), son fácilmente fermentables por numerosas levaduras, mientras que la galactosa solo lo hace algunas especies.
- ❖ Producir altas concentraciones de alcohol. Es importante desde el punto de vista económico pues es significativo la incidencia del contenido alcohólico que se obtenga en los medios con los costos de recuperación de éste por destilación.
- ❖ Tolerar altas concentraciones de alcohol.
- ❖ Poseer características estables y uniformes, pues si varían las mismas durante el proceso industrial (por cambios, variaciones o mutaciones), no se garantiza un eficiente proceso.
- ❖ Mantener su eficiencia a valores de pH alrededor de 4, ya que en estas condiciones elimina la posibilidad de una contaminación bacteriana.
- ❖ Mantener su eficiencia a valores de temperatura alrededor de 35 °C, ya que en el proceso fermentativo se genera calor, que eleva la temperatura a valores que pueden pasar de 40 °C. Las temperaturas óptimas de producción de alcohol para la mayoría de las levaduras está alrededor de 30 °C. Contar con cepas que puedan ser eficientes a 35 °C es muy conveniente.

Algunas especies capaces de producir fermentación alcohólica son las levaduras *Torulopsis*, *Cándida*, ciertas especies *Mucor* y algunas bacterias, sin embargo, la más importante es la *Saccharomyces* (Figura 13). El género *Saccharomyces* incluye numerosas especies. Entre los géneros más utilizados están:

---

<sup>27</sup> Alcohol orgánico: otra alternativa de diversificación [en línea]. Lima: Centro Universitario José Martí, 2005. [consultado 20 de febrero, 2006]. Disponible en Internet: <http://www.monografias.com>

*Saccharomyces cerevisiae*, (Prescott, Samuel Cate,1962), *S. ellipsoideus*, *S. anamensis*, *Candida pseudotropicalis*, (Quintero, R.R,1981), (Revista Centro azúcar N- 1,año 27,octubre –diciembre 2000), *C.shehatae* (Rodríguez rodee Armas M.C,1985), *S. carlsbergensis*, *Kluyveromyces marxianus* (Roger P,1978), (Silvia M.G,1981), *Candida bytyrii*, *Pichia stipatis*, entre otros, (Pelayo O.C,1990), (Smidrkarl,M;Nejedly, 1989)<sup>28</sup>.

La levadura *Saccharomyces Cerevisiae* es ampliamente utilizada para la producción comercial de etanol de materiales almidonados. Como la *Saccharomyces Cerevisiae* carece de enzimas amilolíticas necesarias para la utilización, aprovechamiento del almidón, la producción que resulta aprovechable en los procesos requiere que un rango de almidón sea gelatinizado por cocción, licuefacción por  $\alpha$  – amilasa en tratamiento y sacarificación a glucosa por glucoamilasas. (Montesinos y Navarro, 2000).

La levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, convierte las hexosas en etanol en condiciones anaeróbicas. En los últimos años se han realizado trabajos interesantes a través de la Ingeniería genética en los que se han obtenido, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* transformadas para la utilización de residuos agrícolas, sueros y almidones, (Triantatyllos, 1994), (Valdés y García, 1997). Igualmente se ha reportado el empleo de cultivos mixtos de *Saccharomyces cerevisiae* – *K. fragilis* a escala industrial y se han obtenido buenos resultados en el grado alcohólico y rendimiento alcohol-sustrato en destilerías cubanas, (Yuji y

---

<sup>28</sup> Alcohol orgánico: otra alternativa de diversificación [en línea]. Lima: Centro Universitario José Martí, 2005. [consultado 20 de febrero, 2006]. Disponible en Internet: <http://www.monografias.com>

Noriaki, 1994). También se ha reportado la utilización de este cultivo mixto en el suero lácteo con buenos resultados<sup>29</sup>.

**Figura 13.** Imagen de microscopía electrónica de barrido de *Saccharomyces Cerevisiae*



Fuente: Vías del Catabolismo [en línea]. Educastur, 2004. [consultado 02 de dic, 2005]. Disponible enInternet:[http://web.educastur.princast.es/proyectos/biogeo\\_ov/2BCH/B3\\_METABOLISMO/t33\\_R\\_ESPIRACION/informacion.htm](http://web.educastur.princast.es/proyectos/biogeo_ov/2BCH/B3_METABOLISMO/t33_R_ESPIRACION/informacion.htm)

<sup>29</sup> *Saccharomyces cerevisiae* [en línea]. México: Departamento De Genetica Molecular, Instituto De Fisiologia Celular. Universidad Nacional Autonoma De Mexico, 2003. [consultado 30 de nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://biblioweb.unam.mx/libros/microbios/Cap16/>

En la actualidad existe una tendencia marcada en la utilización de bacterias, entre ellas *Zymomonas mobilis*, (Suárez y Michelena, 1988) que muestra la capacidad de producir etanol a partir de glucosa, con rendimientos y productividades muy atractivas y alta tolerancia al etanol. La *Zymomonas mobilis*, convierten un mol de hexosa en un mol de etanol, liberando tan sólo un mol de ATP, lo que resulta en mayores rendimientos (hasta un 97% del máximo teórico). Esta bacteria tiene una alta tolerancia al alcohol ( $100\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), pero su rango de sustratos fermentables es también muy estrecho (glucosa, fructosa y sacarosa; Claassen et al., 1999; Flawgood, 1985). Además, su uso en los cultivos a partir de jarabe de caña de azúcar conlleva al aumento de la viscosidad de los caldos de fermentación y de sorbitol, lo cual reduce la eficiencia de la conversión de sacarosa a etanol (Doelle y Doelle, 1989; Grote y Rogers, 1985). Se han evaluado otros microorganismos con capacidad de hidrolizar la celulosa, de asimilar pentosas y de trabajar en condiciones termofilicas, ya que el incremento de la temperatura acelera los procesos metabólicos y disminuye las necesidades de refrigeración. Entre los microorganismos de este tipo se encuentran levaduras como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* y *Pachysolen tannophilus*, pero su tasa de producción de etanol a partir de glucosa es por lo menos cinco veces menor a la observada para *S. cerevisiae* (Claassen et al., 1999). Otro grupo importante de microorganismos productores de etanol son los clostridios termofilicos y sacarolíticos como *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *C. thermosaccharolyticum* y *C.thermocellum*, los cuales pueden sintetizar hasta dos mol de etanol por mol de hexosa. La principal desventaja es que su tolerancia al alcohol es muy baja, por lo que las máximas concentraciones alcanzadas son menores a  $30\text{g/l}$  <sup>30</sup>.

---

<sup>30</sup> Optimization of fermentation conditions for the production of etanol from sago starch by co-immobilized amyloglucosidase and cells of *Zymomonas mobilis* using response surface methodology [en línea]. India: Enzyme and microbial technology, 2005. [consultado 20 de ene, 2006]. Disponible en Internet: <http://www.elsevier.com/locate/emt>.



**1.4.2. Factores de crecimiento.** El crecimiento y funcionamiento de los microorganismos depende fundamentalmente de las reacciones metabólicas. De estas reacciones es que las células obtienen la energía y los materiales para las diferentes funciones en sus procesos de vida. Los siguientes son los factores que ayudan al desempeño de los microorganismos durante los fenómenos asociados al proceso biotecnológico<sup>31</sup>:

- ❖ Presencia y concentración adecuada de sustratos y nutrientes (vitaminas, minerales, etc.) necesarios para el metabolismo. Se aconseja 450 g de levadura por cada 1.000 l de mezcla.
- ❖ Ausencia de compuestos químicos que interfieran con las enzimas.
- ❖ Temperatura adecuada para el funcionamiento óptimo de las enzimas y los microorganismos. La temperatura recomendada para la máxima producción de levadura se encuentra a 36° C. El coeficiente crecimiento (gramos de levadura producidos por hora por gramo de levadura presente), a 20°C es 0.149, a 30°C es 0.311 y a 36° C 0.342, lo cual significa que este aumenta la temperatura (J- White y D. J. Muñiz, 1951). En la mayoría de las levaduras la máxima temperatura para el crecimiento se halla entre 34 y 47° C.
- ❖ Presencia o ausencia de oxígeno para microorganismos aeróbicos o anaeróbicos, respectivamente. Las levaduras son microorganismos anaerobios facultativos, aunque se ha probado que en escasa proporción son capaces de desarrollarse bajo condiciones anaerobias por completo. En presencia de oxígeno, el crecimiento de la levadura es mucho mas vigoroso que en cultivos bajo condiciones en que no es posible el acceso de oxígeno.
- ❖ Ajuste de pH adecuado para el funcionamiento óptimo de las enzimas y los microorganismos. El crecimiento y la fermentación de la levadura dependen en alto grado de la reacción del medio nutritivo. El pH optimo para el crecimiento

---

<sup>31</sup> Alcohol orgánico: otra alternativa de diversificación [en línea]. Lima: Centro Universitario José Martí, 2005. [consultado 20 de febrero, 2006]. Disponible en Internet: <http://www.monografias.com>

de la *Saccharomyces cerevisiae* es entre 4,4 – 4,8. En las alcoholeras generalmente se trabaja a un pH alrededor de 4,2 para evitar contaminaciones en el medio de microorganismos indeseables.

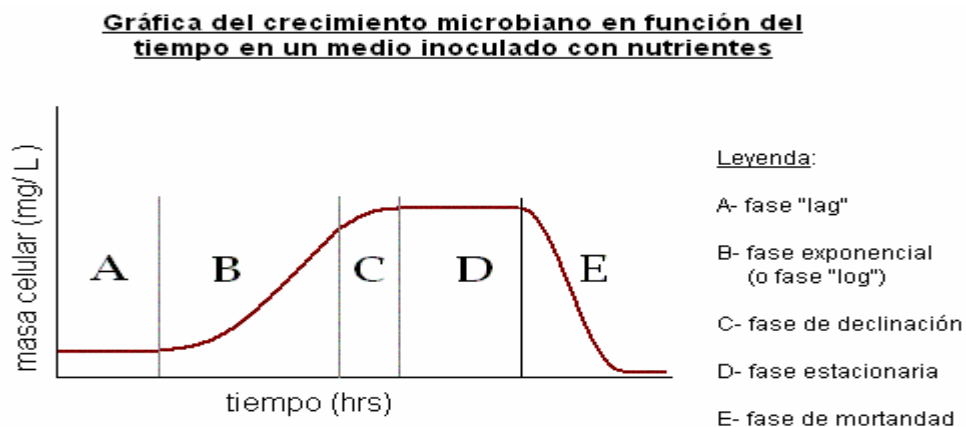
- ❖ Concentración baja de productos que inhiban las enzimas durante el proceso.
- ❖ Condiciones adecuadas que permitan el transporte de los nutrientes al interior de las células. Esto incluye distribución adecuada de los nutrientes mediante un mezclado efectivo, actividad de agua, concentración de compuestos que afecten la presión osmótica (como las sales).
- ❖ Ausencia de microorganismos que compitan en el consumo del sustrato y produzcan compuestos indeseados o compuestos que afecten el metabolismo del microorganismo utilizado. Esta situación está íntimamente relacionada con las condiciones asépticas durante el manejo de los microorganismos.
- ❖ Potencial de óxido – reducción. El eH es la fuerza reductora de hidrogeno gaseoso de una atmósfera de presión, que ha sido activada por un electrodo de platino. Los eH expresan, por tanto, la relación de hidrogeno y oxigeno de una solución. El punto neutro es 21, correspondiente a un pH igual 7. El margen vital de las levaduras se extiende por lo general desde eH 10 hasta eH 27.5. A ambos lados de esta cifra, el potencial de oxido – reducción resulta tóxico para los microorganismos. La mayoría de los sacamicetes prefieren cifras rH alrededor de 20. Sin embargo las levaduras pueden acostumbrarse a vivir a un valor bajo de potencial de oxidación y reducción.

La mayor parte del etanol es producido mediante fermentación por lotes. La concentración de sustrato (azúcares) al inicio de la fermentación es de 15 a 25% (p/v) y el pH es ajustado a un valor de 4 a 5. Estos procesos se lleven a cabo generalmente entre 30 y 35 °C con rendimiento del 90% del máximo teórico. El resto del sustrato es convertido en biomasa y otros metabolitos. La concentración de etanol al terminar la fermentación es de 80-100g\*L<sup>-1</sup> (Claassen, 1999). En la mayoría de las destilerías, el tiempo de fermentación es de 24h, aumentándose en

6h por la sedimentación de las levaduras en los tanques (Pandey y Agarwal, 1993)<sup>32</sup>.

**1.4.3. Cinética del crecimiento de los microorganismos.** Para una solución acuosa que contiene suficiente cantidad de nutrientes, a una temperatura adecuada, pH óptimo y demás condiciones que permitan el crecimiento de un microorganismo en particular y si se mide periódicamente la cantidad de células presentes, se observará un crecimiento en la presencia de los microorganismos. Este crecimiento se puede medir en Unidades Formadoras de Colonia (CFU) o en masa de microorganismos (biomasa). Al graficar la concentración de biomasa en función del tiempo, se observa que sigue un patrón. La mayoría de los microorganismos siguen un patrón similar al ilustrado en la Figura 14.<sup>33</sup>

**Figura 14.** Crecimiento microbiano en la fermentación



Fuente: La fermentación [en línea]. Journal of molecular catálisis, 2004. [consultado 05 de nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://biblioweb.unam.mx/libros/microbios/Cap16/>

<sup>32</sup> Improvement of ethanol production from starch by recombinant yeast through manipulation of environmental factor [en línea]. Turkey, Enzyme and microbial technology, 2002. [consultado 04 de mar, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.elsevier.com/locate/enzmictec>.

<sup>33</sup> La fermentación [en línea]. Journal of molecular catálisis, 2004. [consultado 05 de nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://biblioweb.unam.mx/libros/microbios/Cap16/>

En la gráfica que se ilustra se observa varias fases del crecimiento microbiano. En la primera, llamada fase "lag" (del inglés "lag-phase") el crecimiento microbiano es casi imperceptible. Se dice que durante esta fase los microorganismos están en una etapa de adaptación a las condiciones ambientales que le rodean. En los procesos comerciales se debe hacer todo lo posible para reducir el tiempo de esta fase pues los costos de producción aumentan en función del tiempo que dure el proceso. Luego viene una fase de crecimiento que se conoce con el nombre de fase exponencial o log (del inglés "log-phase"). Durante la fase log el crecimiento de microorganismos sigue un patrón exponencial. La razón de este comportamiento es que muchos microorganismos se reproducen formando dos células hijas a partir de una célula madre (la cual desaparece durante la división celular). Si por ejemplo el tiempo promedio de reproducción de un microorganismo fuera 20 minutos y se empezara con una concentración 10 células por mililitro, el crecimiento observado desde el momento en que empieza la fase log estaría dado como se muestra en la Tabla 7 <sup>34</sup>.

**Tabla 7.** Crecimiento de microorganismos en la fermentación

<b>Ejemplo del crecimiento de microorganismos en función del tiempo (fase log)</b>	
<b>tiempo (hrs)</b>	<b># de células</b>
0.0	10
1.0	80
2.0	640
3.0	5,120
4.0	40,960
5.0	327,680
6.0	2,621,440
7.0	20,971,520

Se asume un tiempo promedio de la división celular de 20 min.

Fuente: La fermentación [en línea]. Journal of molecular catálisis, 2004. [consultado 05 de nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://biblioweb.unam.mx/libros/microbios/Cap16/>

<sup>34</sup> La fermentación [en línea]. Journal of molecular catálisis, 2004. [consultado 05 de nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://biblioweb.unam.mx/libros/microbios/Cap16/>

En la fase log. la expresión matemática que describiría el crecimiento de microorganismos en función del tiempo estaría dada por la ecuación (6)

$$X_t = X_0 2^n \quad (6)$$

Aquí  $X_t$  es la concentración de microorganismos a tiempo  $t$ ,  $X_0$  es la concentración inicial de microorganismos y  $n$  es el número de replicaciones de las células (asumiendo que todas ellas se reproducen a un tiempo fijo). El valor de  $n$  puede ser sustituido por la razón del tiempo  $t$  que ha ocurrido desde el momento en que empieza la fase "log" y el tiempo promedio  $t_0$  en que tarda una célula en reproducirse. Luego de la fase "log" se encuentra una fase de decrecimiento en donde la razón de producción de masa celular por unidad de tiempo va disminuyendo. Se entra luego a la fase estacionaria en donde no hay cambios considerables en la población total de microorganismos. Finalmente, cuando el sustrato se acaba, se comienza una fase de mortandad en donde se reduce la población microbiana<sup>35</sup>.

## 1.5. DESTILACIÓN

La destilación es una operación utilizada con frecuencia para la purificación y aislamiento de líquidos orgánicos. La destilación se basa en las volatilidades de los componentes líquidos a separar.

---

<sup>35</sup> Enzimas de Interés Industrial [en línea]. Bogotá: Universidad Nacional, 2005. [consultado 25 nov, 2005]. Disponible en Internet: [http://www.biogestion.unal.edu.co/proyecto\\_10.htm](http://www.biogestion.unal.edu.co/proyecto_10.htm)

La destilación depende de parámetros como: El equilibrio liquido vapor, temperatura, presión, composición, energía<sup>36</sup>.

#### 1.5.1. Clasificación de la destilación. Existen los siguientes tipos:

- ❖ Destilación simple o sencilla.
- ❖ Destilación Fraccionada.
- ❖ Destilación por Arrastre de vapor.
- ❖ Destilación a presión reducida o al vacío.

**1.5.1.1. Destilación Simple.** El líquido se destila desde el matraz de destilación, ocurriendo primero la vaporización y estableciéndose el equilibrio liquido vapor. Parte del vapor se condensa en las paredes del matraz, pero la gran parte pasa por la salida lateral condensándose debido a la circulación del agua fría por el tubo refrigerante, a este producto se le conoce como, “**destilado**”, y a la porción que queda en el balón de destilación el “**residuo**”, se debe mantener el ritmo de destilación, manteniendo continuamente una gota de condensado en el bulbo del termómetro. Para evitar el sobrecalentamiento de los líquidos es necesario introducir en el balón, núcleos de ebullición y mantener constante el ritmo de destilación. La destilación simple es aplicable en los sistemas que contengan líquidos orgánicos de puntos de ebullición bastante diferenciados, ejemplo: Sistema butanos-etanol, agua-metanol<sup>37</sup>.

---

<sup>36</sup> Producción de alcohol a partir de mandioca [en línea]. Departamento de alimentos I.N.T.N, 2005. [Consultado 15 de oct, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.sciencedirect.com>.

<sup>37</sup> Destilación [en línea]. De Wikipedia, la enciclopedia libre, 2005. [Consultado 20 de oct, 2005]. Disponible en Internet: <http://es.wikipedia.org/wiki/>

**1.5.1.2. Destilación fraccionada.** La destilación fraccionada no es nada más que una técnica para realizar una serie completa de pequeñas separaciones (destilación simple), en una operación sencilla y continua. Una columna de destilación fraccionada proporciona una gran superficie para el intercambio de calor, en las condiciones de equilibrio, que se establece entre el vapor que asciende y el líquido (condensado) que desciende. Esto tiene como consecuencia una serie completa de evaporaciones y condensaciones parciales en toda la longitud de la columna de fraccionamiento. Cuando el condensado en algún punto de la columna toma calor del vapor, parte se evapora de nuevo y el vapor formado es mas rico en el componente mas volátil (el de menor ebullición). Al mismo tiempo, cuando el vapor cede calor al condensado, parte del mismo se condensa, siendo este condensado mas rico en el componente menos volátil (el de mayor punto de ebullición), bajo este panorama podemos decir que partiendo de la base de la columna, a medida que aumenta la altura aumenta el enriquecimiento del componente más volátil e inversamente con el componente menos volátil. También se establece a lo largo de la columna un gradiente de temperaturas que varían desde el punto de ebullición del componente **X** hasta el punto de ebullición del componente **Y**. Existe una influencia adicional al equilibrio termodinámico liquido-vapor, y este es el intercambio de energía (perdida) que se verifica a lo largo de la columna de fraccionamiento<sup>38</sup>.

**1.5.1.3. Destilación al vacío.** Muchas sustancias no pueden purificarse por destilación a la presión ordinaria, por que se descomponen a temperaturas cercanas a su punto de ebullición normal, en otros casos la destilación requiere de inmensas inversiones o utilización de energía en gran cantidad, o finalmente

---

<sup>38</sup> Destilación [en línea]. Lima: Centro Universitario José Martí, 2005. [consultado 20 de febrero, 2006]. Disponible en Internet: <http://www.monografias.com/trabajos15/separacion-mezclas/separacion-mezclas.shtml>

poseen problemas de equilibrio liquido-vapor, en consecuencia se emplea el método de destilación al vacío o a presión reducida.

**1.5.1.4. Destilación por arrastre de vapor.** Es una técnica que sirve fundamentalmente para separar sustancias insolubles en agua y literalmente volátiles, de otros productos no volátiles mezclados con ellas. Este método es un buen sustituto de la destilación al vacío, y tiene algunas ventajas, ya que esta destilación se realiza a temperaturas bajas.



## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1. MATERIALES

**2.1.1. Almidón.** Para la determinación de las variables que más influyen en la producción de etanol a partir del almidón de yuca, se trabajó con el almidón producido por la empresa MAIZENA S.A YUCARINA, que tiene una composición del 100% de almidón de yuca.

Se utilizaron cajas de 300g que fueron adquiridas en el almacén ÉXITO del centro comercial Unicentro de la ciudad de Cali. En la tabla 8 se especifican los lotes y fechas en que se trabajaron:

**Tabla 8.** Identificación del almidón utilizado

Lote	Fecha de vencimiento	Número de cajas utilizadas	Fecha en que se utilizó
3	14 agost. / 07	3	02 oct – 16 dic. /05
2	20 oct. / 07	3	18 ene– 2 mar. /06
2	10 ene. / 08	1	24 abr - 5 may. /06
3	23 jul. / 07	2	5 may– 31 may/06
2	09 dic. /07	4	1 jun – 25 jul. / 06

**2.1.2. Enzimas.** Se utilizó la  $\alpha$  – amilasa *Spezyme* de Genencor International® para la hidrólisis del almidón de yuca y la  $\alpha$  – glucoamilasa *Optidex* de Genencor International® para la sacarificación.

Para obtener los mejores resultados con las enzimas propuestas, se seleccionaron los parámetros de proceso de dichas enzimas a través de una minuciosa búsqueda bibliográfica.

## **2.2. GELATINIZACIÓN DEL ALMIDÓN DE YUCA**

Los ensayos de gelatinización se hicieron completamente al azar y por duplicado. Se utilizaron soluciones de 100g con concentraciones de almidón del 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 y 20% (w/w), determinando la velocidad de gelatinización a través de las curvas de tiempo (min) temperatura (°C). Los ensayos se hicieron en un rango entre el 5 y el 20%, según lo encontrado en la bibliografía, para la mayor parte de las hidrólisis enzimáticas de sacarificación o conversión a etanol.

Se analizó la relación existente entre la viscosidad y la concentración del almidón a una temperatura determinada para todas las muestras.

Los gramos de almidón se pesaron en un vaso de 200ml utilizando una Balanza digital OHAUS. El peso se completó a 100g con agua destilada. El pH fue ajustado a 6.0 con NaOH 0.1N y controlado con un pHmetro EC-10.

Para producir un hinchamiento en los gránulos del almidón, se calentó la solución con agitación constante en planchas de calentamiento marca Thermolyne Cimarec y registrando los cambios de temperatura que se producían a medida que pasaba

el tiempo. Se tomaron los registros de temperatura a los cinco minutos de iniciada la coción y luego cada dos minutos hasta obtener un gel consistente.

Después de enfriar el gel a temperatura ambiente, se midió su viscosidad en un viscosímetro Brookfield digital modelo DV-I+ a una velocidad de 100 rpm con la aguja número 6.

## **2.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN DE YUCA**

**2.3.1. Procedimiento.** Se realizó la hidrólisis del almidón de yuca, controlando la temperatura de sacarificación, el tiempo de sacarificación, la dosis de enzima, el pH y la concentración de almidón. Se trabajó de forma continua para evitar que los geles sufrieran una retrogradación por enfriamiento y se produjera una disminución en el porcentaje de hidrólisis. Los pasos que se siguieron en la hidrólisis de almidón de yuca fueron los siguientes:

- ❖ **Obtención del gel.** Teniendo en cuenta los resultados de la etapa de gelatinización, se trabajó con geles de 10, 15 y 20% (p/p) de concentración de almidón en soluciones de 100 ml.
- ❖ **Adición de enzima.** Con las micropipetas de Pipetman Starter Kit se aplicó una dosis de enzima según la cantidad de almidón presente en la solución y el tipo de enzima a experimentar.
- ❖ **Licuefacción.** La licuefacción se llevó a cabo en un baño INDULAB de referencia 009 1 – T con agitación constante. La temperatura y el tiempo se ajustaron según el diseño de experimentos.

- ❖ **Choque térmico.** Se sometió la solución hidrolizada a un choque térmico con hielo y sin agitación, por espacio de 15 min para garantizar que la reacción se detuviera. Luego la suspensión se refrigeró a 4°C por 12 horas para facilitar la centrifugación.
- ❖ **Centrifugación.** Se realizó a 12°C en la centrífuga CLAY ADAMS DYNAC III de 12 puestos. Dependiendo de la concentración de almidón de la muestra se utilizaron diferentes tiempos y velocidades que garantizaron una eficiente separación del almidón no hidrolizado de la solución.
- ❖ **Filtración.** Para evitar que algunos restos de almidón de yuca no hidrolizado pasaran al clarificado, la solución se filtró en un sistema de filtración al vacío con un filtro HACH COMPANY 2530-00 de poro de 1.5 µm/Filter Glass FBR 47MM PK/100. El filtro seco junto con el almidón retenido sobre su superficie se secó en una estufa HACH Gravity Oven a 50°C hasta un peso constante. Se anotó en cada caso, el peso inicial del filtro seco.
- ❖ **Secado.** El almidón no hidrolizado, se retiró con una microespátula de los tubos de la centrífuga y se colocó en cápsulas de porcelana, las cuales se secaron en una estufa HACH Gravity Oven a 50°C hasta peso constante. El rendimiento gravimétrico se calculó de acuerdo con la ecuación 7:

$$\% \text{ hidrólisis} = \frac{\text{Almidón inicial} - \text{Almidón no hidrolizado}}{\text{Almidón inicial}} * 100 \quad (7)$$

El almidón no hidrolizado fué el almidón seco de la cápsula más el almidón seco del filtro.

Con el sobrenadante se tomaron por duplicado muestras de un mililitro y se le midieron los °Brix con un refractómetro Hand – Held Refractometer ATAGO ATC – 1E Brix 0 – 32%.

### **2.3.2 Diseño de experimentos para la hidrólisis del almidón de yuca**

**2.3.2.1. Diseño Factorial.** Se utilizó un plan de experimentos que produjera una información confiable con un número de ensayos mínimo. Con este fin se utilizó un diseño factorial  $2^n$ , donde 2 corresponde al número de niveles utilizado en el diseño (mínimo y máximo) y n es el número de variables independientes de dicho proceso.

**2.3.2.2. Determinación de las variables y sus niveles.** El primer paso fue la escogencia de las variables a controlar durante el proceso y sus niveles mas adecuados. Después de una búsqueda bibliográfica y de efectuar algunos ensayos preliminares, se encontraron las variables independientes que tienen influencia sobre el proceso como pH, concentración de almidón, dosis de enzima, temperatura y tiempo de hidrólisis y sacarificación. Se escogió como variable dependiente o de respuesta el % de hidrólisis de almidón.

Los rangos de trabajo de cada variable independiente se encontraron por ensayos de familiarización. El mayor valor de cada rango se seleccionó como nivel máximo y el menor valor como nivel mínimo.

**2.3.2.3. Método para el análisis de las variables de proceso.** La selección de las variables que más influyen en la etapa de hidrólisis y sacarificación se hizo estadísticamente mediante un diseño factorial. Los ensayos se hicieron al azar y por duplicado. De acuerdo con los resultados de los ensayos de familiarización, se

analizaron las variables: concentración de almidón, dosis de enzima y temperatura de sacarificación para la *Spezyme*, dando un total de 20 ensayos ( $2^n = 2^3 = 8$  y por duplicado 16 ensayos del diseño factorial y 4 réplicas del punto central). Para la *Optidex* se analizaron las variables concentración de almidón y dosis de enzima, dando un total de 12 ensayos ( $2^n = 2^2 = 4$  y por duplicado 8 ensayos del diseño factorial y 4 réplicas del punto central).

Con la ayuda del software STATGRAPHICS Plus 2.0. se realizó la optimización mediante un modelo rotacional central compuesto de las variables más significativas en el proceso de hidrólisis del almidón de yuca. Con el fin de obtener un número de ensayos mayor al número de coeficientes a determinar en el modelo matemático, a partir del cual se construyen las curvas de superficie de respuesta, se hicieron otros ensayos que corresponden a los denominados puntos estrella ( $2^{k/4}$ , donde k corresponde al número de variables a optimizar: tres para la hidrólisis y dos para la sacarificación). En las tablas 9 y 10 se especifican los ensayos a realizar con la enzima *Optidex* y en las tablas 11 y 12 con la enzima *Spezyme*.

**Tabla 9.** Descripción de las variables a analizar con *Spezyme Fred*

Variables de Proceso	Niveles		
	-	0	+
X <sub>1</sub> : Concentración de Almidón	10	15	20
X <sub>2</sub> : Temperatura de Sacarif. °C	30	50	70
X <sub>3</sub> : Dosis de enzima µl.	1/1	6.5/1	12/1

**Tabla 10.** Ensayos de optimización a realizar con *Spezyme*

Ensayo	$X_1$	$X_2$	$X_3$
1	-	-	-
a	+	-	-
b	-	+	-
c	-	-	+
ab	+	+	-
ac	+	-	+
bc	-	+	+
abc	+	+	+
0,0,0	0	0	0
$-\alpha, 0, 0$	-1.682	0	0
$\alpha, 0, 0$	1.682	0	0
$0, -\alpha, 0$	0	- 1.682	0
$0, \alpha, 0$	0	1.682	0
$0, 0, -\alpha$	0	0	- 1.682
$0, 0, \alpha$	0	0	1.682

**Tabla 11.** Descripción de las variables independientes a analizar con *Optidex*

Variables de Proceso	Niveles		
	-	0	+
X <sub>1</sub> : Concentración de Almidón	10	15	20
X <sub>2</sub> : Dosis de enzima µl.	2/1	3/1	4/1

**Tabla 12.** Ensayos a realizar con *Optidex*

Ensayo	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>
1	-	-
A	-	+
B	+	+
Ab	+	-
0, 0	0	0
-α, 0	-1.414	0
α, 0	1.414	0
0, -α	0	- 1.414
0, α	0	1.414



### **3. ANÁLISIS DE RESULTADOS**

#### **3.1. GELATINIZACIÓN DEL ALMIDÓN DE YUCA**

Durante el calentamiento en agua del almidón de yuca se percibieron tres etapas:

- ❖ En la primera etapa, no aumenta notoriamente la viscosidad y la solución conserva su apariencia. Esta etapa ocurre en promedio hasta los 55°C, por encima de ésta temperatura se empieza a percibir cambios en la apariencia de la solución.
- ❖ En la segunda etapa, hay un aumento notorio y rápido de la viscosidad de la suspensión y el aspecto de la solución es más blanca con un suave olor. Esta etapa se percibe por encima de los 58°C.
- ❖ Durante la tercera etapa, la solución es un gel de color blanco de sabor y olor suave. Cuando los geles se encuentran entre 64 y 68°C, obtienen estas características y es más notorio en soluciones con concentraciones de almidón de yuca mayores al 10%.

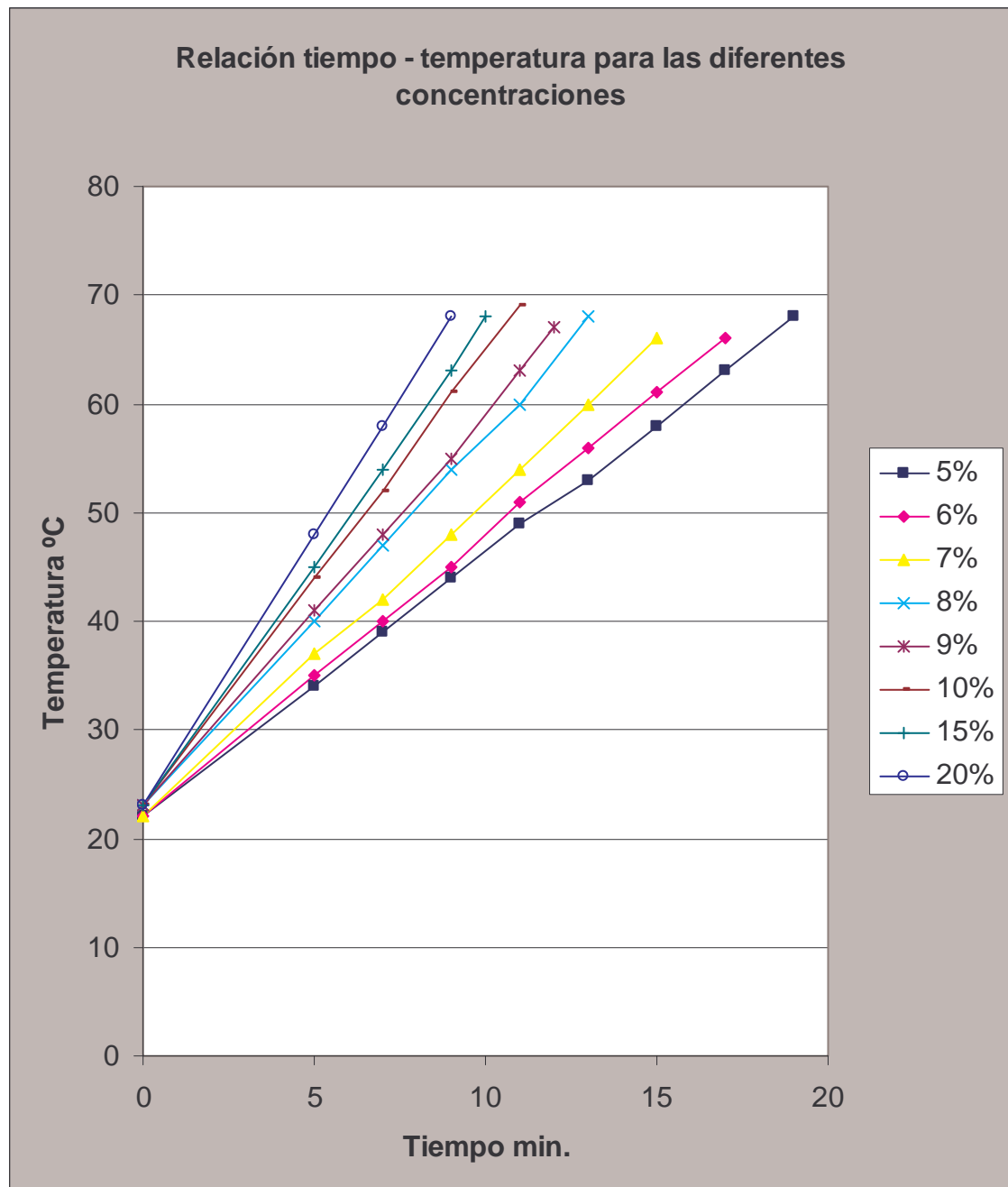
En la gelatinización del almidón de yuca se logró determinar la temperatura promedio en que los gránulos de almidón lograban su máximo hinchamiento, el tiempo requerido para gelatinizarse, la viscosidad de los geles de almidón y el cambio de temperatura a través del tiempo, esto para las diferentes concentraciones de almidón (ver Tabla 13).

**Tabla 13.** Resultados en la etapa de gelatinización

Concentración de almidón de yuca en la s/n	Tiempo de calentamiento a 5 Hert (min.)	Temperatura gelatinización °C	Viscosidad Cp aguja 6 y 100 rpm
5%	19	70	2800
6%	17	68	5100
7%	15	68	7600
8%	13	69	9500
9%	12	66	11600
10%	11	69	15200
15%	10	68	16300
20%	9	68	18400

De acuerdo con la tabla anterior y a la Figura 15, se encontró que la temperatura promedio en que se alcanza la gelatinización es de 68°C, coincidiendo con los estudios hechos por Wikipedia la enciclopedia libre del 2005 que señala que el rango de temperaturas en que los gránulos de almidón de yuca alcanzan la gelatinización es de 62 – 68°C (Tabla 6). Por lo anterior, el almidón de yuca requiere menor consumo de energía durante la producción de gel y ofrece mayores oportunidades de comercialización, ya que en algunos casos la modificación química a realizar es más sencilla y menos costosa cuando se efectúa a partir de este almidón que partiendo de otros como el de maíz o de papa que requieren temperaturas más altas puesto que sus gránulos son hinchados moderadamente debido a sus bajos picos de viscosidad.

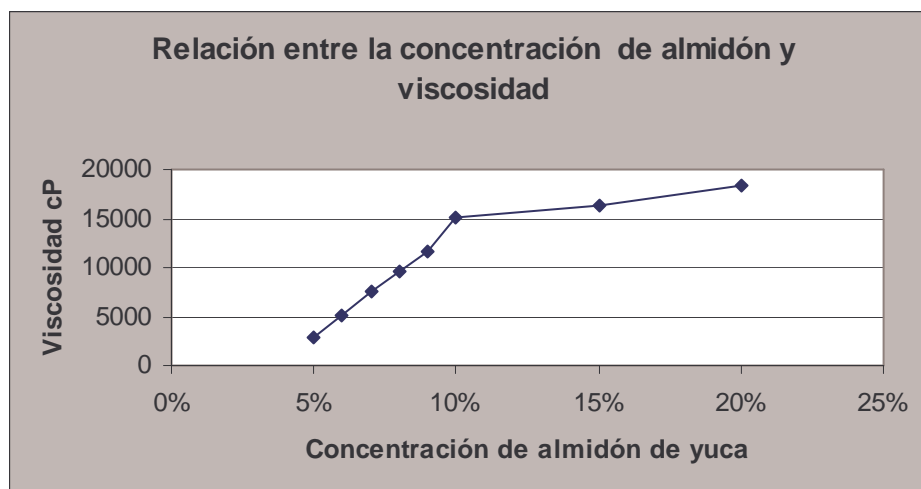
**Figura 15.** Relación Tiempo (min.) – Temperatura (°C) para las diferentes concentraciones de almidón de yuca en las soluciones



Como se muestra en la figura anterior, existe una relación inversa entre el tiempo de gelatinización y la concentración de almidón de yuca en las soluciones. A mayor concentración de almidón, menor es el tiempo requerido para la gelatinización; es decir, que los cambios de temperatura a través del tiempo son mayores cuando las concentraciones de almidón son altas (>10%) como se indicó en la Tabla 13.

En cuanto a la viscosidad ocurre lo contrario, las pastas que tienen mayor concentración de almidón de yuca alcanzan mayores viscosidades, es decir que hay una relación directa entre la concentración de almidón de yuca en la solución y las viscosidades como lo afirmaron en Wikipedia, la enciclopedia libre, 2005. debido principalmente al aumento en la concentración de sólidos. También es de observar que el aumento de la viscosidad es lineal y casi se triplica en el rango entre el 5 y el 10% de concentración de sólidos. Por encima de este rango y hasta el 20%, el aumento de viscosidad es más lento y alcanza su máximo valor a 18400 cP. (Figura 16),

**Figura 16.** Relación concentración de almidón de yuca y la viscosidad



### 3.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN DE YUCA

**3.2.1. Resultados obtenidos con la enzima *Spezyme Fred*.** Por búsqueda bibliográfica se determinó las variables que podían influir en el rendimiento de la hidrólisis con *Spezyme Fred*. La Tabla 14 define cada variable del proceso encontrada.

**Tabla 14.** Variables de procesos para la enzima *Spezyme Fred*

Variables de Proceso	Niveles		
	-	0	+
X <sub>1</sub> : Concentración de Almidón	10	15	20
X <sub>2</sub> : Temperatura de Sacarif. °C	30	50	70
X <sub>3</sub> : Dosis de enzima µl.	1/1	105/20	190/20
X <sub>4</sub> : Tiempo de Sacarificación min	5	30	55
X <sub>5</sub> : pH	5	6	7

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de familiarización (Tabla 15) se determinó que las variables que más influyen en el porcentaje de hidrólisis son las normalizadas como X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub>., por lo tanto son variables que se tuvieron en cuenta en los ensayos de optimización. En el caso de la concentración del almidón y la temperatura de sacarificación, se mantuvieron los niveles planteados en la tabla 14 puesto que ofrecen una significativa modificación del porcentaje de la hidrólisis. Para la dosis de enzima, su influencia es percibida pero no fue tan fuerte como en el caso de la concentración del almidón y la temperatura, entonces se modificaron los niveles de los ensayos de optimización para determinar el nivel de influencia sobre el porcentaje de la hidrólisis como se especifica en la tabla 9. Como las variables pH y tiempo de sacarificación, no ofrecieron cambios sustanciales en el porcentaje de la hidrólisis, sus valores pH de 6.0 y tiempo se

mantuvieron constantes para todos los ensayos de optimización, tiempo de sacarificación de 60 min y un pH de 6.0.

**Tabla 15.** Resultados obtenidos en los ensayos de familiarización para la enzima *Spezyme Fred*

Concentración almidón %	Temperatura Sacarif. °C	Tiempo sacarif. Min	Dosis enzima µl	pH	%hidrólisis
10	50	5	52.5	6	83.3
10	50	55	52.5	6	86.4
10	50	55	10	6	83.9
10	50	55	95	6	87.0
10	70	55	95	6	92.6
10	30	55	95	6	82.3
10	70	55	95	5	93.0
10	70	55	95	7	91.5
15	50	30	78.8	6	69.6
15	50	30	78.8	6	74.2
15	50	30	78.8	6	70.7
20	50	30	105	5	57.8
20	50	30	105	7	55.3
20	50	30	190	5	63.7
20	50	30	20	5	49.5
20	50	55	190	5	64.0
20	50	5	190	5	49.2
20	70	55	190	5	84.2
20	30	55	190	5	59.4

Los ensayos de optimización se realizaron a un pH de 6.0 y un tiempo de sacarificación de 60 min, se obtuvo los siguientes resultados.

**Tabla 16.** Resultados hidrólisis enzimática del almidón de yuca con *Spezyme Fred*

Ensayo	X <sub>1</sub> %	X <sub>2</sub> °C	X <sub>3</sub> μl	%Hidrólisis	° Brix
1	10	50	10	85.6	11.0
1'	10	50	10	86.7	10.2
a	20	50	20	61.8	15.0
a'	20	50	20	60.0	14.6
b	10	70	10	93.2	10.0
b'	10	70	10	95.4	10.2
c	10	50	120	87.9	9.4
c'	10	50	120	87.0	9.4
ab	20	70	20	92.3	23.0
ab'	20	70	20	92.9	22.2
ac	20	50	240	62.6	15.0
ac'	20	50	240	61.8	16.0
bc	10	70	120	97.5	11.6
bc'	10	70	120	95.9	11.6
abc	20	70	240	85.8	21.2
0,0,0	15	60	97.5	78.3	13.2
abc'	20	70	240	83.5	20.6

0,0,0	15	60	97.5	79.5	15.4
0,0,0	15	60	97.5	77.4	14.0
0,0,0	15	60	97.5	78.0	13.8
- $\alpha$ ,0,0	6.6	60	97.5	98.5	7.0
- $\alpha$ ,0,0 ‘	6.6	60	97.5	98.7	6.4
$\alpha$ ,0,0	23.4	60	97.5	66.0	22.2
$\alpha$ ,0,0 ‘	23.4	60	97.5	66.5	21.4
0,- $\alpha$ ,0	15	43	97.5	66.0	13.0
0,- $\alpha$ ,0 ‘	15	43	97.5	67.1	12.4
0, $\alpha$ ,0	15	77	97.5	96.0	16.8
0, $\alpha$ ,0 ‘	15	77	97.5	97.1	15.8
0,0,- $\alpha$	15	60	2.3	73.0	14.6
0,0,- $\alpha$ ‘	15	60	2.3	73.6	14.6
0,0, $\alpha$	15	60	237	85.7	15.2
0,0, $\alpha$ ‘	15	60	237	84.8	15.8

De la tabla anterior podemos observar que la variable temperatura produce en el nivel alto considerables aumentos del % hidrólisis, mientras que en su nivel bajo se percibe un decremento del rendimiento. Para los niveles bajos de  $X_1$  y  $X_3$  el cambio de temperatura del nivel bajo al alto ocasiona que el % hidrólisis se eleve en un 8%, para los niveles altos de  $X_1$  y  $X_3$  eleva en un 22% los rendimientos. Teniendo en cuenta que la temperatura en el nivel alto ofrece mejores rendimientos, entonces al analizar la variación de la concentración de almidón y manteniendo la dosis de enzima en el nivel bajo, se observó que el nivel bajo de la



concentración de almidón aumenta un 2% el rendimiento de la hidrólisis. Si se mantiene la dosis de enzima y la temperatura en los niveles altos, la variación de concentración de almidón ocasiona un incremento del 12% al pasar del nivel bajo al alto.

**Tabla 17. Tabla ANOVA para la enzima *Spezyme Fred***

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:X1	2061,58	1	2061,58	238,49	0,0000
B:X2	2181,63	1	2181,63	252,38	0,0000
C:X3	43,0602	1	43,0602	4,98	0,0366
AA	66,6917	1	66,6917	7,72	0,0113
AB	338,56	1	338,56	39,17	0,0000
AC	26,7806	1	26,7806	3,10	0,0929
BB	46,976	1	46,976	5,43	0,0298
BC	16,6056	1	16,6056	1,92	0,1803
CC	11,5035	1	11,5035	1,33	0,2616
blocks	0,3362	1	0,3362	0,04	0,8456
Total error	181,533	21	8,64441		
Total (corr.)	4932,46	31			

R-squared = 96,3196 percent  
 R-squared (adjusted for d.f.) = 94,814 percent  
 Standard Error of Est. = 2,94014  
 Mean absolute error = 1,89471  
 Durbin-Watson statistic = 2,291

La tabla ANOVA muestra que las tres variables y la interacción de las variables temperatura y concentración de almidón son estadísticamente significativas ( $p\text{-value} < 0.05$ ) sobre el %Hidrólisis. En cuanto a los efectos correspondientes de las interacciones de la variable de dosis de enzima no juegan un papel importante en el % Hidrólisis.

El R – cuadrado indica que el modelo así ajustado explica el 96.3% de la variabilidad en el % hidrólisis. El estadístico R – cuadrado ajustado, que es más

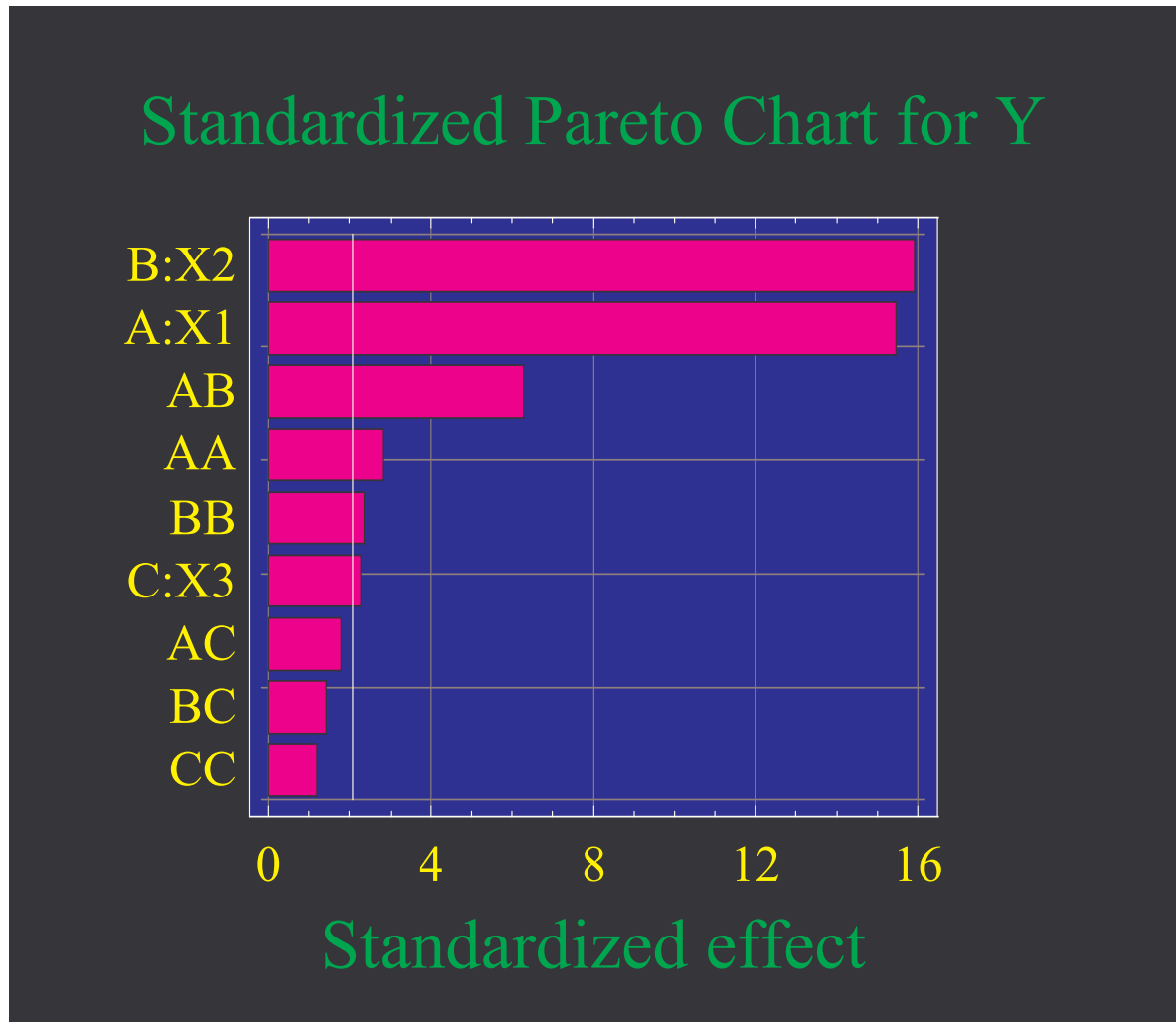
adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes en de 94.8%, por el valor alcanzado en el R – cuadrado se puede decir que el modelo se ajusta correctamente a la variabilidad de análisis. El error estándar de la estimación muestra la desviación normal de los residuos de 2.94. El error absoluto de la media que es el valor promedio de los residuos es de 1.89.

Para visualizar de forma más clara y ordenada la influencia de las variables en el %Hidrólisis, se realizó una gráfica de Pareto que muestra que para la enzima *Spezyme Fred* las variables que más influyen sobre el rendimiento son la concentración de almidón, y temperatura de sacarificación y en menor proporción la dosis de enzima, como lo indica la Figura 17.

La gráfica de Pareto muestra que la variable Temperatura (X2) tiene mayor influencia sobre el % Hidrólisis, seguida de la variable Concentración de Almidón (X2) que también ejerce efectos significativos sobre el rendimiento. En cuanto a la variable Dosis de enzima, el gráfico muestra que influye sobre el % Hidrólisis pero dicha influencia no es tan severa como en el caso de X1 y X2.

Para las interacciones, el gráfico de Pareto indica que solo la combinación de Temperatura y Concentración de almidón influyen sobre el rendimiento. El resto de combinaciones no producen cambios significativos en el % Hidrólisis puesto que no traspasan la línea vertical que representa el test del 95 de nivel de significación.

**Figura 17.** Grafica de Pareto. Enzima Spezyme Fred



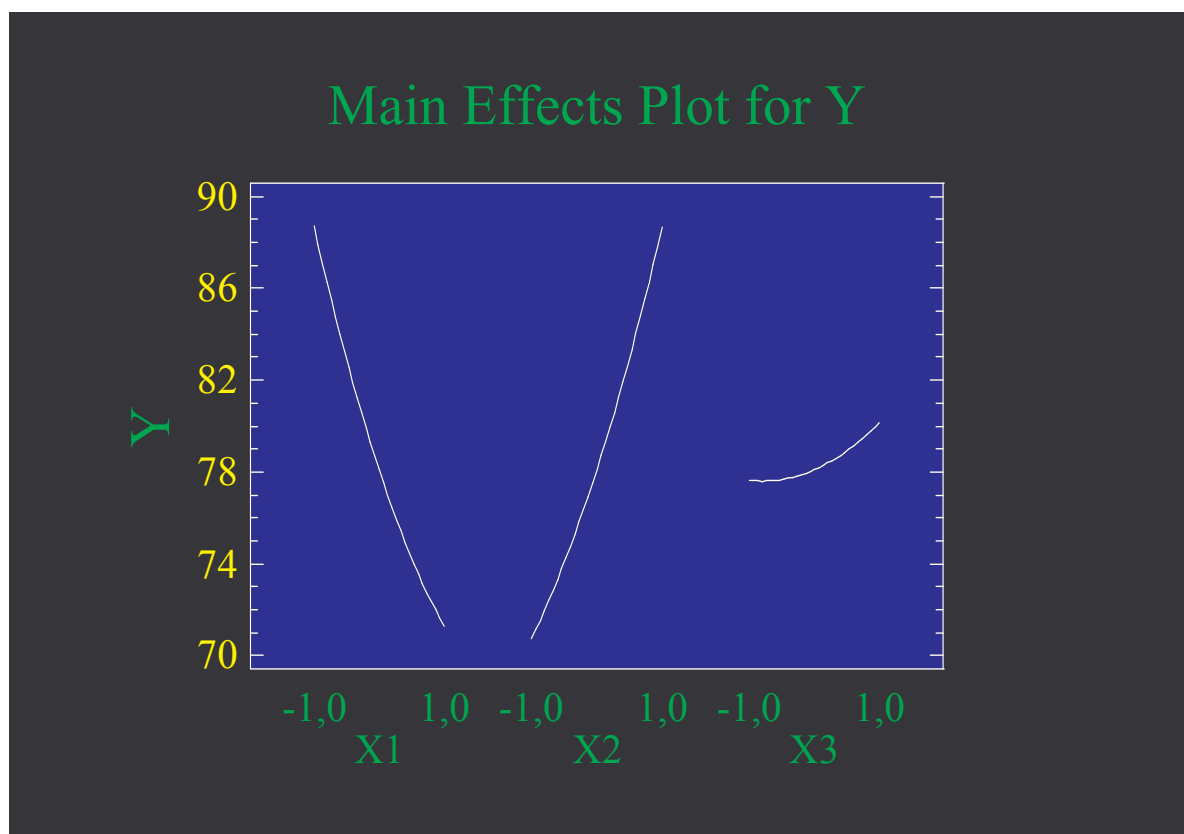
En la Figura 18 se enseñan los comportamientos de cada variable en sus niveles mínimo y máximo.

Para la Concentración de almidón (X1), se observa que a medida que pasar del nivel mínimo al máximo produce una reducción significativa en el % Hidrólisis, es decir que existe una relación inversa a mayor % de almidón en la solución, menor es el rendimiento de la hidrólisis.

En el Tiempo de sacarificación (X2), se observa que es la variable que produce más cambios en el % Hidrólisis con una relación directa entre el cambio de temperatura y el rendimiento de la hidrólisis. El aumento de temperatura produce incrementos en el rendimiento de la hidrólisis de forma significativa.

En el caso de la dosis de enzima (X3), aunque existe una relación directa con el % Hidrólisis, esta influencia no es tan significativa como en el caso de las dos variables antes mencionadas.

**Figura 18.** Efectos de las variables en los % Hidrólisis

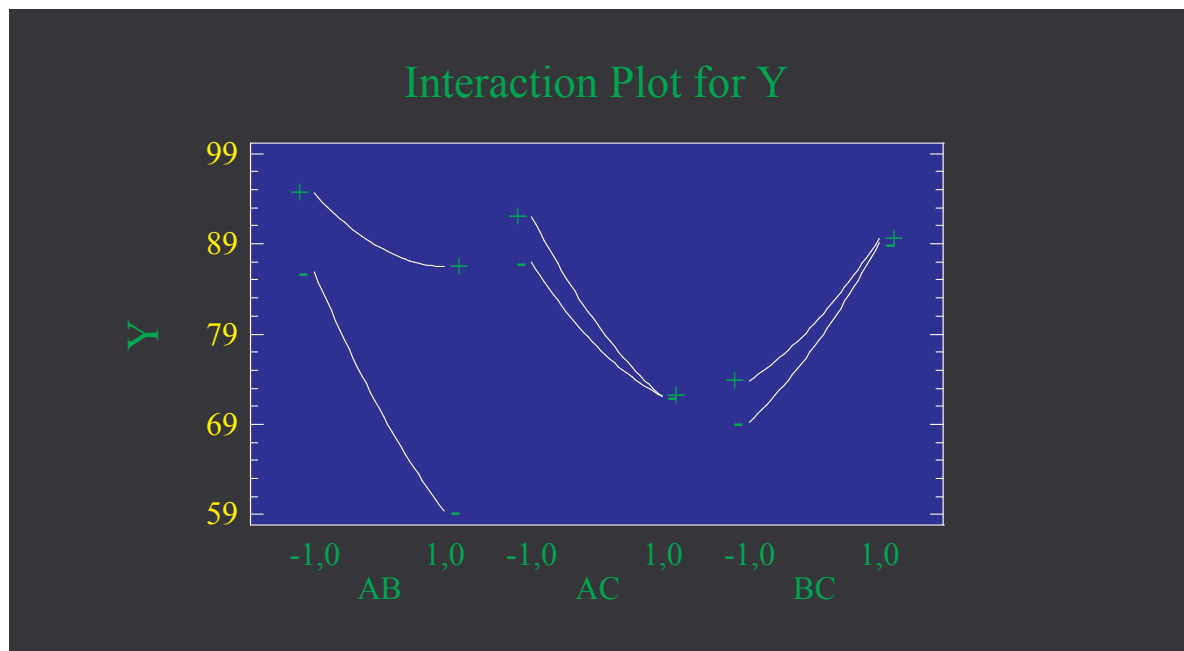


En la Figura 19. se representan las interacciones de las variables con sus correspondientes efectos sobre el % Hidrólisis. Para la interacción Concentración

de almidón y Temperatura de sacarificación, se encontró que el aumento de temperatura y la disminución de la concentración de almidón, producen aumentos significativos en el rendimiento de la hidrólisis.

Si analizamos Concentración de almidón y Dosis de enzima, encontramos que no se producen aumentos significativos en el % Hidrólisis. En el nivel alto de la Concentración de almidón, se observa que al aumentar la dosis de enzima no produce aumento en el rendimiento de hidrólisis. En el caso de las variables Temperatura y Dosis de enzima, se analiza que no producen aumentos relevantes en el % Hidrólisis. En el nivel alto de Temperatura se observa que aunque se aumente la Dosis de enzima no hay un aumento en el rendimiento de la hidrólisis.

**Figura 19.** Efecto de las interacciones de las variables sobre el % Hidrólisis



El modelo matemático establecido por medio del programa STATGRAPHICS Plus 2.0 para la enzima *Spezyme Fred* se expresa en la siguiente ecuación:

**Ecuación 8:**

$$\% \text{ Hidrolisis} = 78.1015 - 8.68781X_1 + 8.93719X_2 + 1.25559X_3 + 1.89723X_1^2 + 4.6X_1X_2 - 1.29375X_1X_3 + 1.59229X_2^2 - 1.01875X_2X_3 + 0.78795X_3^2$$

Para encontrar los valores óptimos de las variables, se derivó parcialmente la ecuación anterior con respecto a cada una de las variables  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ .

$$\frac{\partial h}{\partial X_1} = -8.68781 + 3.79446X_1 + 4.6X_2 - 1.29375X_3 = 0 \quad (8.1)$$

$$\frac{\partial h}{\partial X_2} = 8.93719 + 4.6X_1 + 3.18458X_2 - 1.01875X_3 = 0 \quad (8.2)$$

$$\frac{\partial h}{\partial X_3} = 1.25559 - 1.29375X_1 - 1.01875X_2 + 1.5759X_3 = 0 \quad (8.3)$$

Se obtiene tres ecuaciones de primer grado con tres incógnitas, por lo tanto con cualquier método que solucione ecuaciones lineales se puede encontrar los valores de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ . Los resultados obtenidos son:

$$X_1 = -7.71469$$

$$X_2 = 7.63518$$

$$X_3 = -2.19446$$

Con la ecuación 8, se puede generar una tabla comparativa entre el valor producido por el modelo y el valor producido experimentalmente. Esta tabla se plantea en la Tabla 18.

**Tabla 18.** Resultados estimados para el % hidrólisis

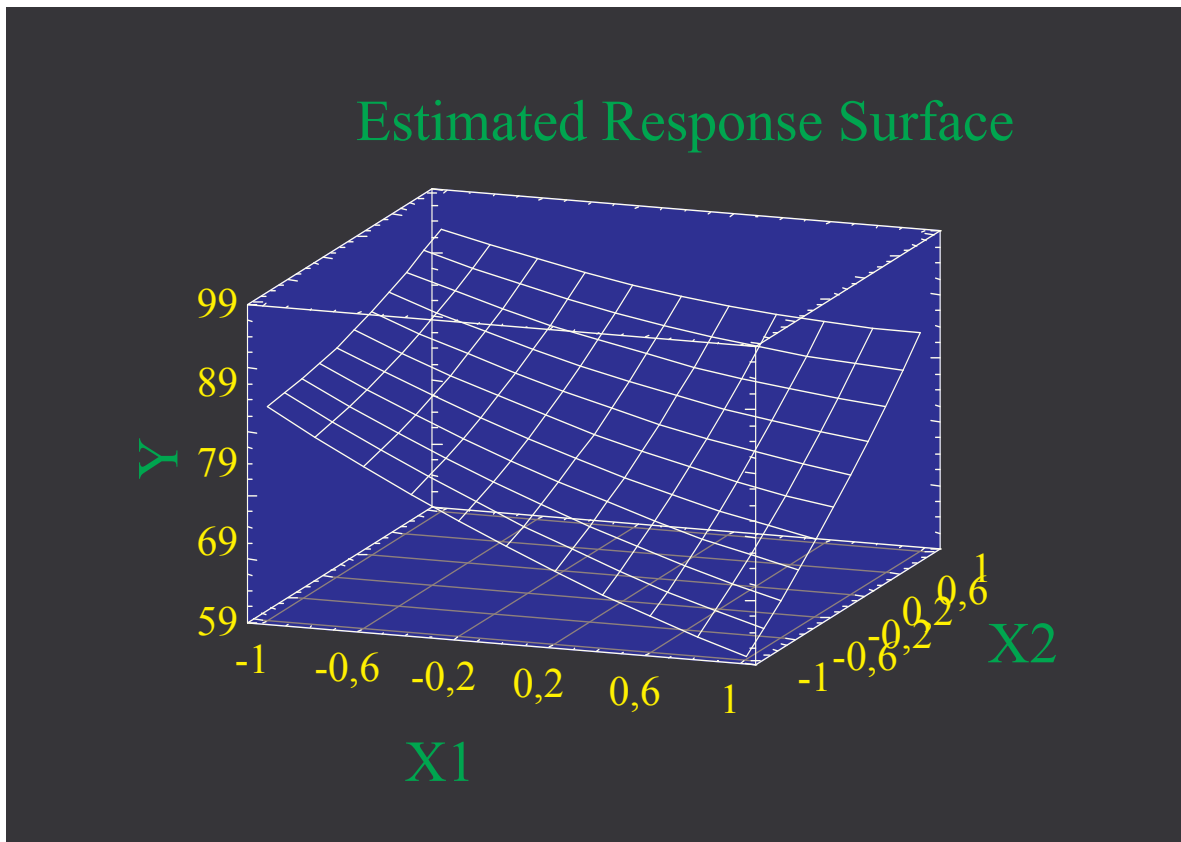
Row	Observed Value	Fitted Value	Lower 95,0% CL for Mean	Upper 95,0% CL for Mean
1	78,3	78,2594	74,9941	81,5246
2	85,6	83,217	79,4812	86,9527
3	61,8	59,1786	55,4429	62,9144
4	93,2	94,0695	90,3337	97,8052
5	92,3	88,4061	84,6704	92,1419
6	87,9	90,3531	86,6174	94,0889
7	62,6	61,1398	57,404	64,8755
8	97,5	97,1307	93,3949	100,866
9	85,8	86,2923	82,5565	90,0281
10	98,5	98,2462	94,6728	101,82
11	66,0	68,9185	65,3451	72,492
12	66,0	67,4191	63,8457	70,9926
13	96,0	97,6956	94,1222	101,269
14	73,0	78,4457	74,8723	82,0192
15	85,7	82,669	79,0956	86,2424
16	79,5	78,2594	74,9941	81,5246
17	77,4	77,9531	74,6879	81,2184
18	86,7	82,9107	79,175	86,6465
19	60,0	58,8724	55,1366	62,6081
20	95,4	93,7632	90,0275	97,499
21	92,9	88,0999	84,3641	91,8356
22	87,0	90,0469	86,3111	93,7827
23	61,8	60,8335	57,0978	64,5693
24	95,9	96,8244	93,0886	100,56
25	83,5	85,9861	82,2503	89,7218
26	98,7	97,9399	94,3665	101,513
27	66,0	68,6123	65,0389	72,1857
28	66,0	67,1129	63,5395	70,6863
29	97,1	97,3893	93,8159	100,963
30	73,6	78,1395	74,566	81,7129
31	84,8	82,3628	78,7893	85,9362
32	78,0	77,9531	74,6879	81,2184

La tabla 18 contiene información acerca de los valores de % hidrólisis generados usando el modelo y los obtenidos experimentalmente. La tabla incluye:

- ❖ Los valores observados de % hidrólisis.
- ❖ Los valores derivados del modelo.
- ❖ 95% del límite de confiabilidad.

Se puede observar que los valores obtenidos u observados no difieren en gran medida de los valores obtenidos del modelo.

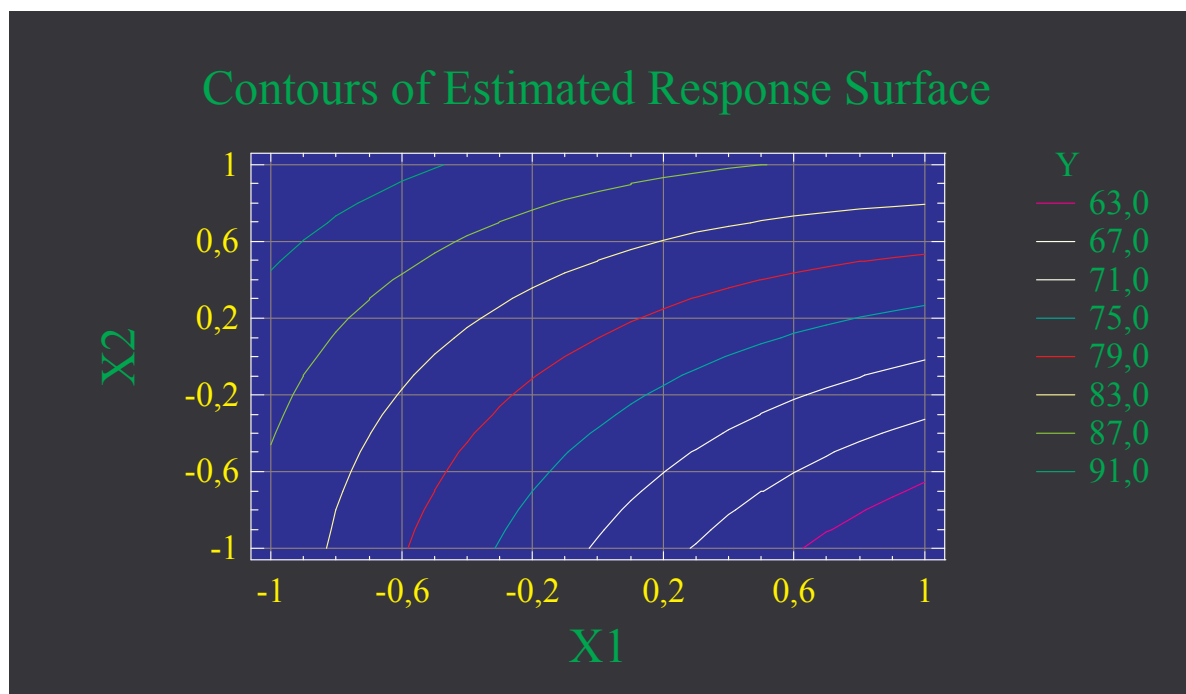
**Figura 20.** Gráfica de Superficie de respuesta para la enzima *Spezyme Fred*





Al hacer un corte bidimensional en la gráfica de superficie de respuesta, se puede definir la región en que se encuentran los mayores valores de % hidrólisis. Esta gráfica puede ser observada en la Figura 21.

**Figura 21.** Contornos estimados de la superficie de respuesta



Con la gráfica anterior, se observa a medida que las curvas a medida que se alejan del nivel superior de la variable  $X_1$  (concentración de almidón) y se acercan al nivel superior de la variable  $X_2$  los mejores rendimientos de la enzima ( $\alpha$  – amilasa) *Spezyme Fred* crecen, es decir que la región que contiene los mayores rendimiento de la hidrólisis está sobre la curva del 91.0% de  $Y$  (% hidrólisis).

De acuerdo a los resultados obtenidos donde se obtuvo los mejores % hidrólisis (96.7%), las condiciones óptimas de trabajo para la enzima *Spezyme Fred* son: pH

6.0, Tiempo de sacarificación 60 min, Temperatura de sacarificación 70 °C, Concentración de almidón 10% y dosis de enzima 12µl / g de almidón (120 µl).

**3.2.2. Resultados obtenidos con la enzima *Optidex*.** Por búsqueda bibliográfica se determinó las variables que podían influir en el rendimiento de la hidrólisis con *Optidex*. La Tabla 19 define cada variable del proceso encontrada.

**Tabla 19.** Variables de procesos para la enzima *Optidex*

Variables de Proceso	Niveles		
	-	0	+
X <sub>1</sub> : Concentración de Almidón	10	15	20
X <sub>2</sub> : Dosis de enzima µl.	62.5	125	187.5
X <sub>3</sub> : Temperatura de Sacarificación °C	30	50	70
X <sub>4</sub> : Tiempo de Sacarificación min	5	30	55

En los dos niveles analizados de la variable concentración de almidón, se percibieron las mismas variaciones de acuerdo a las modificaciones de las variables restantes. Se observó que a menor temperatura el % de hidrólisis mejoraba en una proporción muy pequeña; por lo tanto se determinó que en los ensayos de optimización la temperatura de sacarificación era de 50 °C. En el caso del tiempo de sacarificación, se aprecia que a mayor tiempo el % hidrólisis aumenta moderadamente, por lo tanto para la optimización se trabajó con una tiempo de sacarificación de 60 min. En el caso de las variables dosis de enzima y concentración de almidón los cambios fueron más notorios ante las variaciones por lo tanto se consideraron las variables a analizar con los ensayos de optimización. Se mantuvo constante el rango de concentración de almidón, pero los niveles en la dosis de enzima se modificaron puesto que se comparó con la

referencia bibliográfica y se estaba trabajando en exceso, los niveles con los que se realizan los ensayos de optimización se identifican en la tabla 20.

**Tabla 20.** Ensayos de familiarización con la enzima *Optidex*

Concentración de almidón %	Dosis enzima μl	Tiempo de sacarificación min	Temperatura sacarificación °C	° Brix	%Hidrólisis
10	62.5	50	30	7.6	69.3
10	187.5	50	30	10.2	78.7
10	187.5	30	30	9.6	77.3
10	187.5	70	30	8.4	75.3
10	187.5	30	5	7.2	51.7
10	187.5	30	55	10.2	81.4
20	62.5	50	30	18.8	62.4
20	187.5	50	30	20.2	68.7
20	187.5	30	30	18.2	65.4
20	187.5	70	30	14.6	48.75
20	187.5	30	5	13.6	39.7
20	187.5	30	55	15.8	53.62
15	125	50	30	13.6	65.4
15	125	50	30	14.8	66.3
15	125	50	30	13.8	64.8

Luego de identificar las variables que más influyen en el % hidrólisis, se procedió a realizar los ensayos de optimización obteniendo los siguientes resultados:

**Tabla 21.** Resultados hidrólisis enzimática del almidón de yuca con *Optidex*

Ensayo	X <sub>1</sub> %	X <sub>2</sub> μl	% Hidrolisis
1	10	20	88.7
1'	10	20	89.3
a	20	40	75.6
a'	20	40	74.1
b	10	40	92.5
b'	10	40	93.4
ab	20	80	79.9
ab'	20	80	81.1
- α , 0	7.9	23.7	95.4
-α , 0'	7.9	23.7	95.6
A, 0	22.1	66.3	31.2
A, 0'	22.1	66.3	33.4
0, - α	15	3.0	55.9
0, - α'	15	3.0	53.8
0, α	15	87.0	87.1
0, α'	15	87.0	88.7
0,0	15	45	84.3
0,0	15	45	83.8
0,0	15	45	84.5
0,0	15	45	84.6

De acuerdo con estos resultados se utilizó el programa STATGRAPHICS Plus 2.0 para analizar la variable que más influye sobre la sacarificación del almidón del yuca. En la Tabla 22 se presentan los resultados del ANOVA (Análisis de Varianza).

**Tabla 22.** Tabla ANOVA para los ensayos con la enzima *Optidex*

Analysis of Variance for Y					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:X1	3363,56	1	3363,56	17,83	0,0010
B:X2	793,342	1	793,342	4,21	0,0610
AA	331,094	1	331,094	1,76	0,2080
AB	1,445	1	1,445	0,01	0,9316
BB	48,009	1	48,009	0,25	0,6224
blocks	0,28322	1	0,28322	0,00	0,9697
Total error	2452,22	13	188,632		
Total (corr.)	6942,87	19			

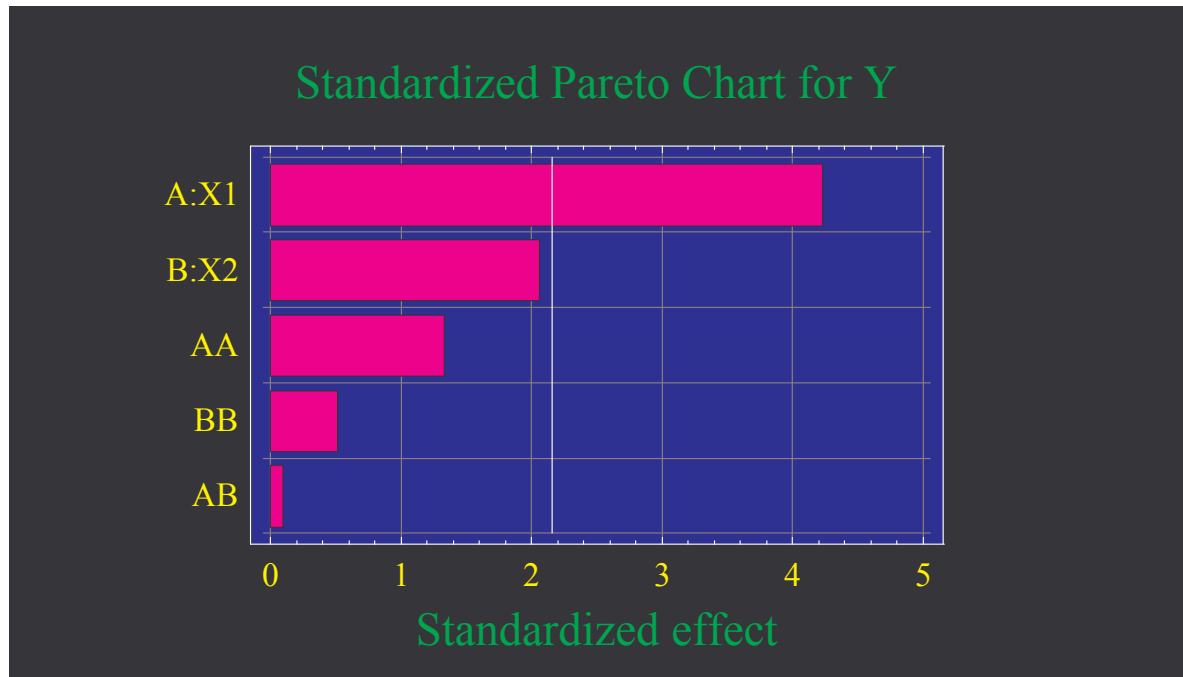
R-squared = 64,68 percent  
R-squared (adjusted for d.f.) = 52,0657 percent  
Standard Error of Est. = 13,7343  
Mean absolute error = 8,1121  
Durbin-Watson statistic = 1,56886

De acuerdo con la tabla anterior, la variable dependiente más significativa ( $p\text{-value} < 0.05$ ) es la concentración de almidón en la solución. No lo es, la dosis de enzima. Esto se corrobora con lo que se presenta en la Tabla 20, ya que el aumento de enzima del nivel inferior al superior, solo produce un aumento de hidrólisis en promedio del 5%, mientras que el cambio de concentración del nivel inferior al superior produce un decrecimiento en el rendimiento de un 14% en promedio.

El R – cuadrado indica que el modelo así ajustado explica el 64.68% de la variabilidad en el % hidrólisis. El estadístico R – cuadrado ajustado, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes en de 52.1%. El error estándar de la estimación muestra la desviación normal de los residuos es de 13.7343. El error absoluto de la media que es el valor promedio de los residuos es de 8.1121.

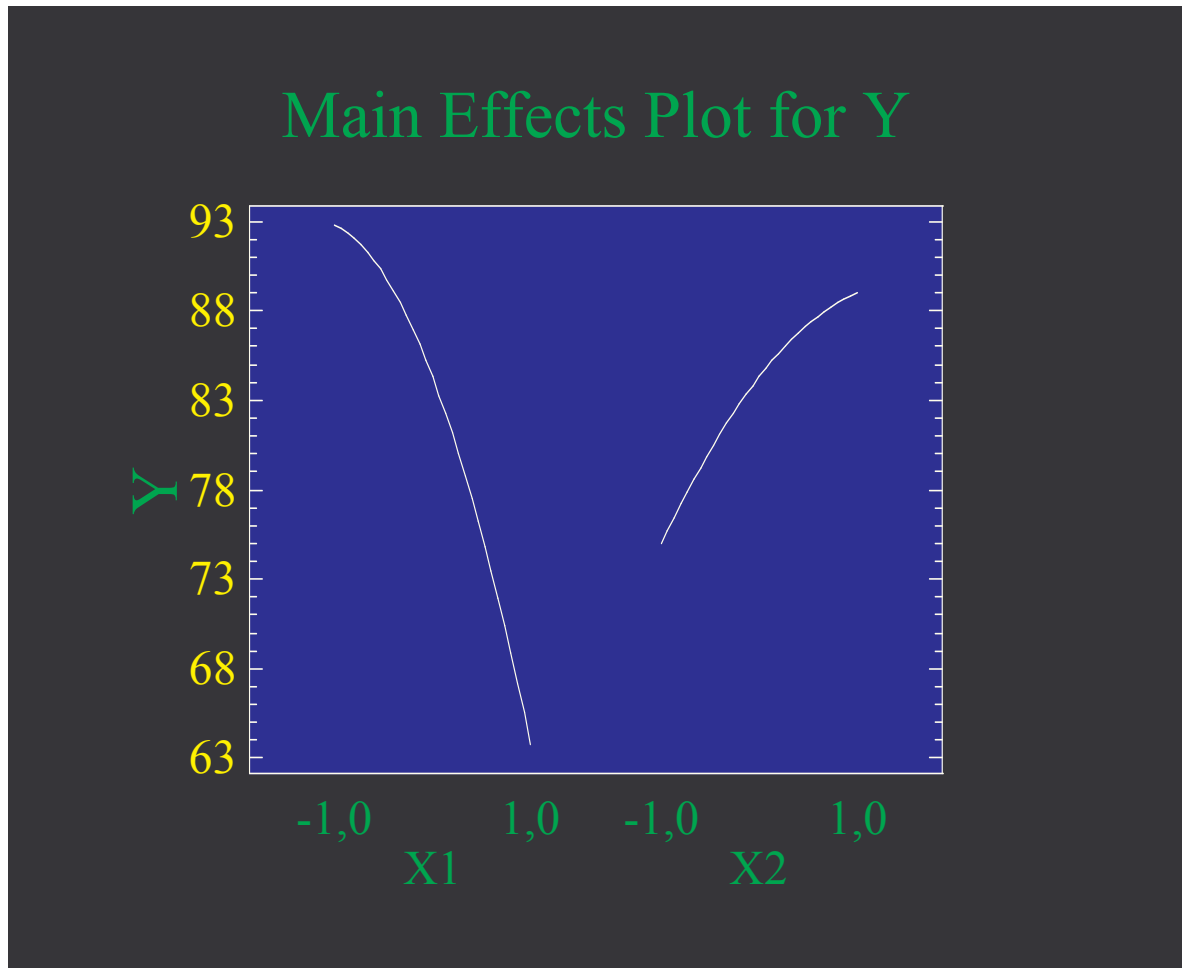
Para visualizar de forma más clara y ordenada la influencia de las variables en el %Hidrólisis, se realizó una gráfica de Pareto que muestra que para la enzima *Optidex*, la variable que más influye en su rendimiento es la concentración de almidón como lo indica la Figura 22. El gráfico de Pareto muestra que el factor concentración de almidón de yuca ( $X_1$ ) posee efectos significativos sobre el % Hidrólisis porque traspasa la línea vertical que representa el test del 95 de nivel de significación.

**Figura 22.** Grafica de Pareto. Enzima *Optidex*



Al analizar la influencia de las concentraciones de almidón, encontramos que manteniendo la dosis de enzima constante el %Hidrólisis aumenta a medida que la concentración de almidón disminuye desde el nivel superior al inferior. Ahora si mantenemos constante la concentración de almidón y variamos la dosis de enzima, se aprecia que el %hidrólisis aumenta moderadamente a medida que aumenta la dosis de enzima del nivel inferior al superior, como lo indica la Figura 23.

**Figura 23.** Efectos de las variables sobre el % de Hidrólisis

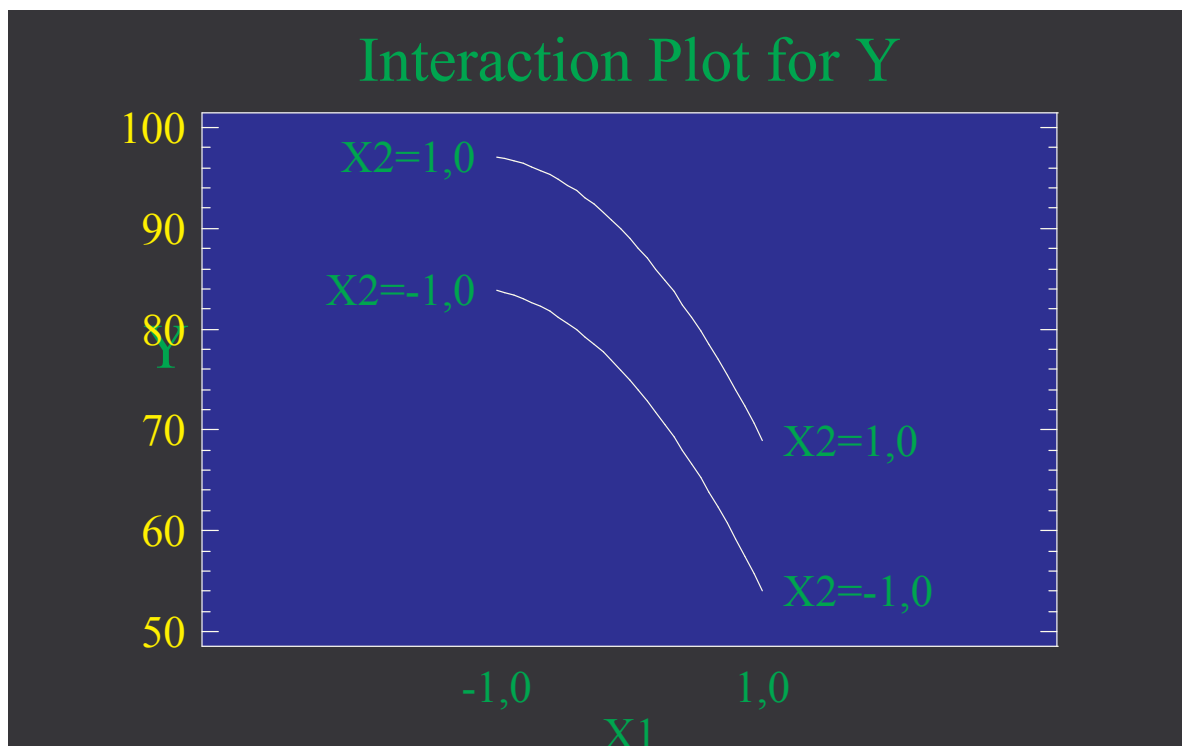


Si se estudian las interacciones entre las variables, encontramos que el mejor rendimiento se obtuvo con el nivel mínimo de concentración de almidón y el nivel superior de dosis de enzima. El diseño fue 10% de almidón de yuca en 100 g de solución con una relación de 4 $\mu$ l / 1g. almidón, obteniendo en promedio un %Hidrólisis de 92.95%.

Si utilizamos el nivel mínimo de concentración de almidón y el nivel mínimo de dosis de enzima, encontramos que el %Hidrólisis es del 89% indicando que la

dosis de enzima no es una variable que influya significativamente en el rendimiento. El mismo fenómeno ocurre con el nivel máximo de concentración de almidón pero los rendimientos se ven significativamente afectados confirmando que la dosis de enzima es la variable que influye en el rendimiento como lo indica la Figura 24.

**Figura 24.** Efecto de las interacciones de las variables sobre el % hidrólisis





El modelo matemático establecido por medio del programa STATGRAPHICS Plus 2.0 para la enzima *Optidex* se representa en la ecuación 9.

### Ecuación 9

$$\% \text{ Hidrólisis} = 84.2924 - 14.4991X_1 + 7.04159X_2 - 6.01778X_1^2 + 0.425X_1X_2 - 2.29151X_2^2$$

Para encontrar los valores óptimos de las variables, se derivó parcialmente la ecuación anterior con respecto a cada una de las variables.

$$\frac{\partial h}{\partial X_1} = -14.4991 - 12.03556X_1 + 0.425X_2 = 0 \quad (9.1)$$

$$\frac{\partial h}{\partial X_2} = 7.04159 + 0.425X_1 + 4.58302X_2 = 0 \quad (9.2)$$

Se obtiene dos ecuaciones de primer grado con dos incógnitas, por lo tanto con cualquier método que solucione ecuaciones lineales se puede encontrar los valores de  $X_1$  y  $X_2$ . Los resultados obtenidos son:

$$X_1 = -1.14669$$

$$X_2 = 1.64278$$

Con la ecuación 9, se puede generar una tabla comparativa entre el valor producido por el modelo y el valor producido experimentalmente. Esta tabla se plantea en la Tabla 23.

**Tabla 23.** Resultados estimados para el % hidrólisis

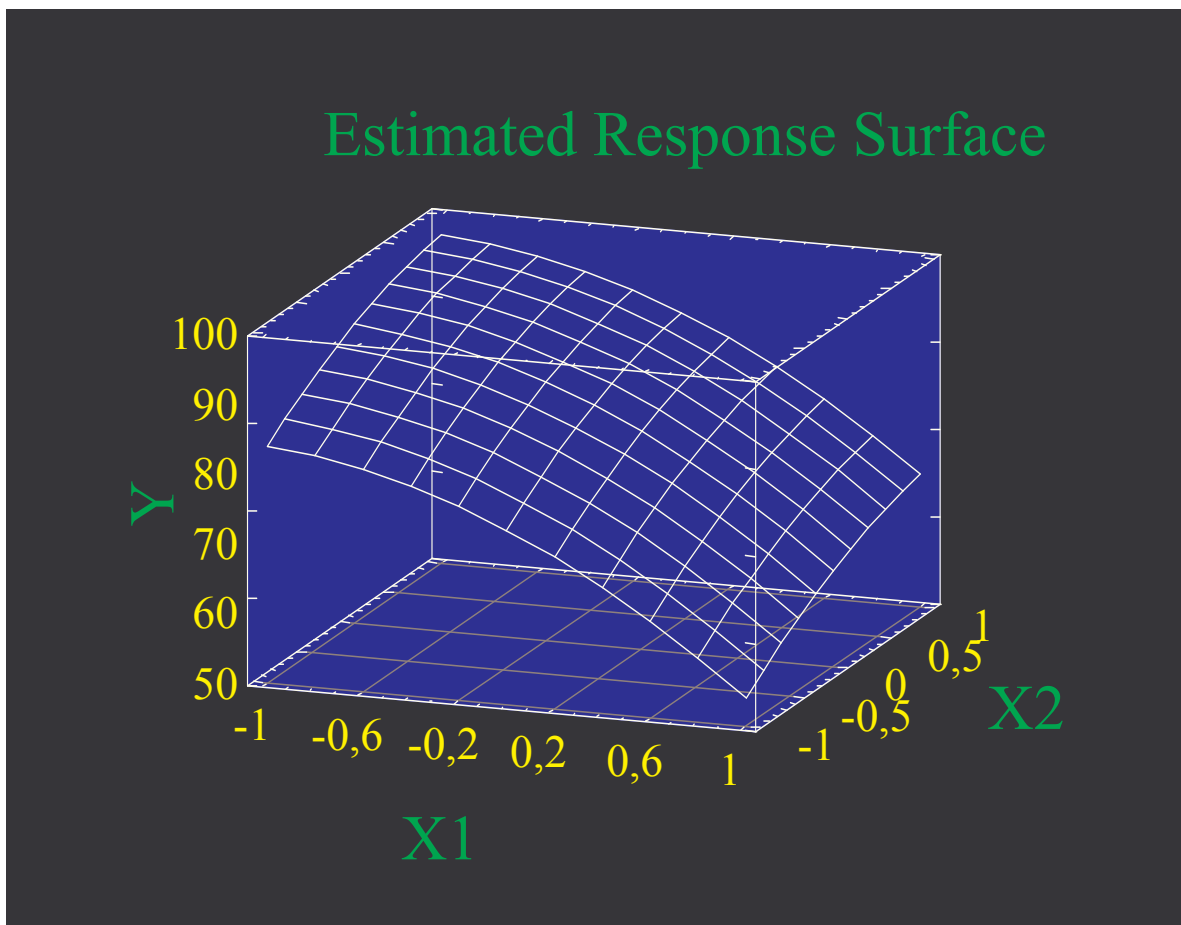
Row	Observed Value	Fitted Value	Lower 95,0% CL for Mean	Upper 95,0% CL for Mean
1	84,3	83,9914	67,9584	100,024
2	88,7	83,8687	66,2444	101,493
3	75,6	54,0241	36,3999	71,6483
4	92,5	96,7377	79,1135	114,362
5	79,9	68,5931	50,9689	86,2173
6	95,4	92,3044	74,6802	109,929
7	31,2	51,2999	33,6758	68,9241
8	55,9	70,1089	52,4847	87,7331
9	87,13	89,5105	71,8863	107,135
10	83,8	83,9914	67,9584	100,024
11	84,5	84,6084	68,5754	100,641
12	89,3	84,4857	66,8614	102,11
13	74,1	54,6411	37,0169	72,2653
14	93,4	97,3547	79,7305	114,979
15	81,1	69,2101	51,5859	86,8343
16	95,6	92,9214	75,2972	110,546
17	33,4	51,9169	34,2928	69,5411
18	55,9	70,7259	53,1017	88,3501
19	88,7	90,1275	72,5033	107,752
20	84,6	84,6084	68,5754	100,641

La tabla 23 contiene información acerca de los valores de % hidrólisis generados usando el modelo y los obtenidos experimentalmente. La tabla incluye:

- ❖ Los valores observados de % hidrólisis.
- ❖ Los valores derivados del modelo.
- ❖ 95% del límite de confiabilidad.

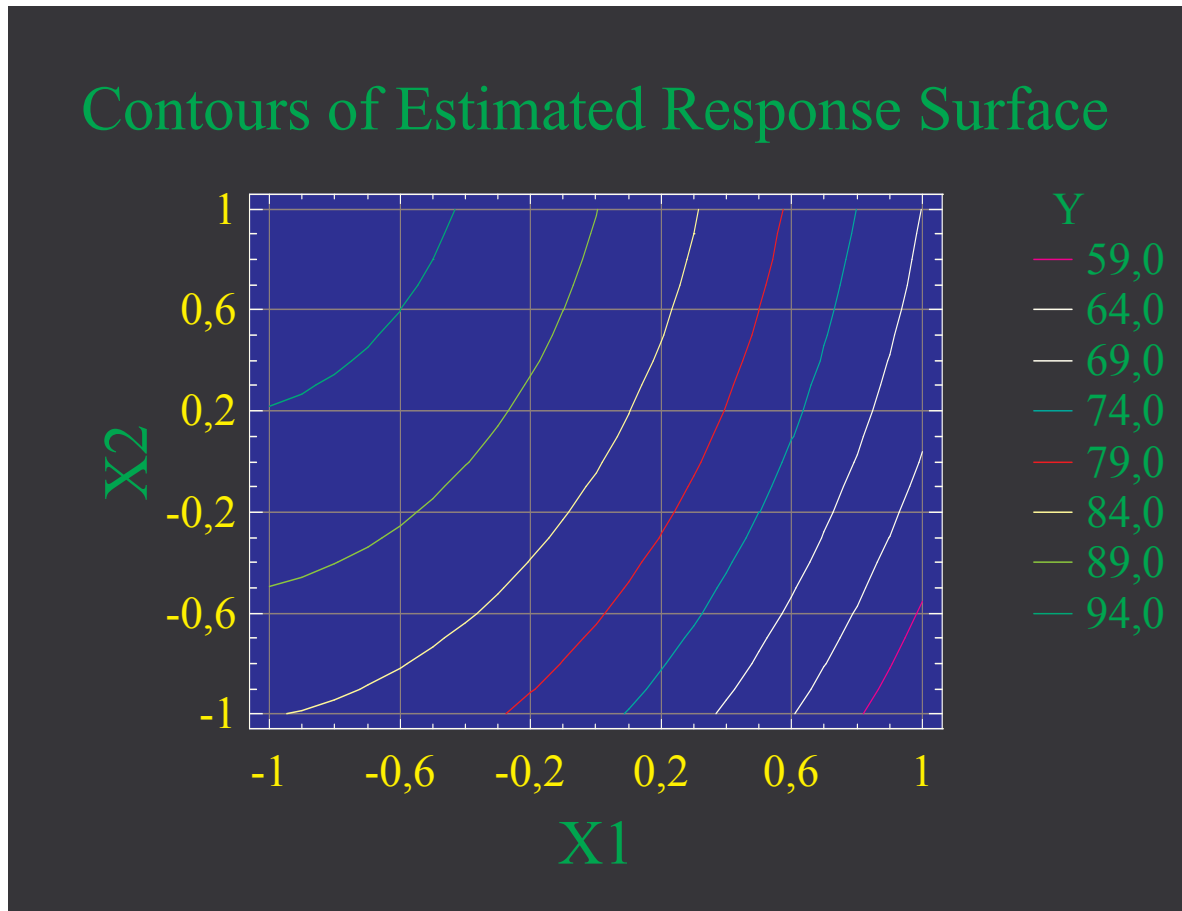
Se puede observar que los valores obtenidos u observados no difieren en gran medida de los valores obtenidos del modelo.

**Figura 25.** Gráfica de superficie de respuesta para la enzima *Optidex*



Al hacer un corte bidimensional en la gráfica de superficie de respuesta, se puede definir la región en que se encuentran los mayores valores de % hidrólisis. Esta gráfica puede ser observada en la Figura 26.

**Figura 26.** Contornos estimados de la superficie de respuesta



Con la gráfica anterior, se observa que a medida que las curvas se alejan del nivel superior de la variable  $X_1$  (concentración de almidón) y se acercan al nivel superior de la variable  $X_2$  (dosis de enzima), se obtienen los mejores rendimientos con la enzima ( $\alpha$  – glucoamilasa) *Optidex*, es decir que la región que contiene los mayores rendimiento de la hidrólisis está sobre la curva del 94.0% de  $Y$  (% hidrólisis).

De acuerdo a los resultados obtenidos donde se obtuvo los mejores % hidrólisis (93.4%), las condiciones óptimas de trabajo para la enzima *Spezyme Fred* son: pH 6.0, Tiempo de sacarificación 60 min, Temperatura de sacarificación 50 °C, Concentración de almidón 10% y dosis de enzima 4µl / g de almidón (40 µl).

De los ensayos realizados con las dos enzimas, se obtuvo mejor rendimiento con la *Spezyme Fred* es decir que hidrolizó mejor el almidón bajo las condiciones establecidas, sin embargo esta enzima por ser una  $\alpha$  – amilasa lleva los gránulos de almidón hasta disacáridos. Para lograr una buena producción de etanol, se requiere que durante la hidrólisis se produzca glucosa que es un monosacárido, por tal razón se realizó dos ensayos por duplicado que combinaron las enzimas bajo las mejores condiciones de las mismas. Esto se plantea puesto que la *Optidex* es una enzima perteneciente a la  $\alpha$  – glucoamilasa que lleva los gránulos de almidón hasta glucosa.

El primer ensayo que se propuso fue adicionar las dos enzimas y dejándolas actuar por 30 min a 60 °C que es la temperatura promedio en que las dos enzimas pueden trabajar.

El segundo ensayo que se propuso fue adicionar primero la  $\alpha$  – amilasa dejándola actuar por 30 min a 70°C que es la temperatura con la que alcanzó mejores rendimientos. Luego se bajó la temperatura a 50 °C para adicionar la  $\alpha$  – glucoamilasa que se deja actuar por otros 30 min.

La forma en que se desarrollaron los ensayos propuestos se enseñan en la tabla siguiente con los respectivos rendimientos.

**Tabla 24.** Rendimiento obtenido con la combinación de las enzimas

Concentración almidón %	pH	Dosis enzimas μl	Temp. °C	Tiempo Min	°Brix	% Hidrolisis
15	6	180 – 60	60	30	13.4	86.27
15	6	180 – 60	60	30	12.6	86.47
15	6	180 – 60	70 – 50	30 – 30	16.2	94.87
15	6	180 - 60	70 – 50	30 – 30	16.2	94.60

Se puede apreciar el aumento significativo en el % hidrólisis utilizando el segundo método propuesto. Por lo tanto se concluye que los valores correspondientes a las variables estudiadas en las dos enzimas son:

Concentración de almidón: 15%

pH en la solución de almidón: 6

Dosis de *Spezyme Fred* : 12 μl / g de almidón

Dosis de *Optidex* : 4 μl / g de almidón

Tiempo requerido para *Spezyme Fred*: 30 min

Tiempo requerido para *Optidex*: 30 min

Temperatura para *Spezyme Fred*: 70 °C

Temperatura para *Optidex*: 50 °C

En los resultados de las investigaciones de School of Biotechnology, University of New South Wales, en el documento Ethanol Production from Cassava Starch Using a Highly Productive Strain of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces uvarum* ATCC 26602, se encuentra que utilizando las enzimas Termamyl y AMG

en la hidrólisis del almidón de yuca se requiere un pH de 6.0 a 8.0 para la Termamyl y de una temperatura óptima de 92°C. Para AMG tenía un pH óptimo de 4.3-5.0, y la temperatura óptima en el rango de 58°C a 65°C, la concentración del almidón fue de 10-120 g / l y se logra la licuefacción usando 0.125 - 0.25% enzima en ambos casos. Obtienen un rendimiento del 90% en la licuefacción en una o dos horas.

En la tesis que tiene por nombre “Estudio preliminar para la obtención de jarabe de glucosa por hidrólisis enzimática del almidón de yuca, utilizando extractos crudos de alfa-amilasa (B. licheniformis) y glucoamilasa (A. niger) de la Universidad de Córdoba, alcanzan una eficiencia del 72.6% en las siguientes condiciones:

B. licheniformis: concentración del almidón 20%, pH 6.5, 3µl / g, 80 °C, 30 min.

A. Níger: 20%, pH 4.5, 65 °C, 45 µl / g, 240 min.

Con los resultados expuestos, concluyo que se logró optimizar a nivel de laboratorio las variables que influyen en la hidrólisis enzimática del almidón de yuca.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la etapa fermentación - destilación que fueron realizadas con los ensayos de la etapa de hidrólisis enzimática.

### 3.3. FERMENTACIÓN Y DESTILACIÓN

La fermentación se realizó manejando las variables pH del mosto, cantidad de levadura (g), tiempo de fermentación y cantidad de alimento. Estas variables se ajustaron de manera experimental guiados por la experiencia en la fermentación de la azúcar morena y por los hallazgos en la bibliografía.

En la primera fermentación la solución preparada con  $\alpha$  – glucoamilasa tenía una concentración de almidón de yuca de 8%, se adicionó 1ml de jugo de limón para ajustar el pH a 4.55, 4 g de levadura *Saccharomycia cerevisiae* de Levapan, 0.5 g de fosfato de amonio que se utiliza como alimento ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ). El volumen a fermentar fue de 316 ml con 8° Brix.

Se utiliza una destilación fraccionada para obtener en un rango de 74 – 76 °C etanol con una eficiencia de la columna del 90%. Del mosto fermentado se tomaron 200 ml cuyo °Brix luego de 5 días fue de 2. Se obtuvo 6.0 ml de etanol (4.82 g) con una densidad de 0.8 g / ml.

Es decir que de los 200 ml que se destilaron, el 3% son etanol. Aunque es un porcentaje bajo comparado con el obtenido con el azúcar (7%), se destaca que solo se utilizó una enzima (*Optidex*) y que pese a ser la primera destilación exitosa, el rendimiento se acerca a la mitad del obtenido con el azúcar.

En la segunda fermentación la solución preparada con  $\alpha$  – glucoamilasa tenía una concentración de almidón de yuca de 10%, se adicionó 4ml de ácido láctico para ajustar el pH a 4.50 g de levadura *Saccharomycia cerevisiae* de Levapan, 0.5 g de fosfato de amonio que se utiliza como alimento ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ). El volumen a fermentar fue de 370 ml con 10.6° Brix y una densidad de 1.04 g / ml.



Se utiliza una destilación fraccionada para obtener en un rango de 74 – 76 °C etanol con una eficiencia de la columna del 90%. Del mosto fermentado se tomaron 200 ml cuyo °Brix luego de 5 días fue de 2.2. Se obtuvo 9.0 ml de etanol (7.11 g) con una densidad de 0.793 g / ml.

Es decir que de los 200 ml que se destilaron, el 4.5% son etanol que es un buen rendimiento y posiciona a la yuca como una buena alternativa para la producción de etanol, al igual que la destilación anterior, solo se utilizó una enzima (*Optidex*).

En la tercera fermentación la solución preparada con  $\alpha$  – amilasa tenía una concentración de almidón de yuca de 15%, se adicionó ácido láctico para ajustar el pH a 4.5, 2.3 g de levadura *Saccharomyciae cerevisiae* de Levapan, 0.23 g de fosfato de amonio que se utiliza como alimento ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ). El volumen a fermentar fue de 230 ml con 11.0° Brix y una densidad de 1.05 g / ml.

Se utiliza una destilación fraccionada para obtener en un rango de 74 – 76 °C etanol con una eficiencia de la columna del 90%. Del mosto fermentado se tomaron 200 ml cuyo °Brix luego de 8 días fue de 7.0. Se obtuvo 4.4 ml de etanol (3.57 g) con una densidad de 0.81 g / ml.

Es decir que de los 200 ml que se destilaron, el 2.2% son etanol. Se esperaba este resultado puesto que la enzima *Spezyme Fred* utilizada en la licuefacción de las muestras, hidroliza los gránulos de almidón hasta disacáridos.

En la cuarta fermentación la solución preparada con  $\alpha$  – glucoamilasa tenía una concentración de almidón de yuca de 15%, se adicionó ácido láctico para ajustar el pH a 4.5, 5.2 g de levadura *Saccharomyciae cerevisiae* de Levapan, 0.5 g de fosfato de amonio que se utiliza como alimento ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ). El volumen a fermentar fue de 520 ml con 13.6° Brix y una densidad de 1.06 g / ml.

Se utiliza una destilación fraccionada para obtener en un rango de 74 – 76 °C etanol con una eficiencia de la columna del 90%. Del mosto fermentado se tomaron 200 ml cuyo °Brix luego de 8 días fue de 3.8. Se obtuvo 13.5 ml de etanol (10.74 g) con una densidad de 0.795 g / ml.

Es decir que de los 200 ml que se destilaron, el 6.8% son etanol. Este ha sido la mayor cantidad extraída utilizando una enzima (*Optidex*) por lo tanto se comprueba que a mayor glucosa producida en la hidrólisis del almidón, mejor es el rendimiento de etanol.

#### 4. CONCLUSIONES

- ❖ En la gelatinización del almidón de yuca se encontró que las soluciones con mayor concentración de almidón requieren menor tiempo para que sus gránulos alcanzaran su máximo hinchamiento; es decir que a medida que disminuye la concentración del almidón en la solución, el tiempo de gelatinización es mayor.
- ❖ La temperatura de gelatinización de las diferentes soluciones de almidón de yuca es en promedio de 68°C, por lo tanto la concentración de almidón no influye en la temperatura de gelatinización.
- ❖ A medida que aumenta la concentración del almidón de yuca en las soluciones, la viscosidad es mayor.
- ❖ En la hidrólisis del almidón de yuca con la enzima *Optidex*, se encontró un máximo rendimiento del 93% en las siguientes condiciones: temperatura de sacarificación de 60°C, tiempo de sacarificación de 1 hora, pH de 6.0, dosis de enzima 40µl y 10% de concentración de almidón.
- ❖ El modelo matemático que describe el proceso de hidrólisis con la enzima *Optidex* contiene las variables con sus efectos demostrando la susceptibilidad del proceso a los cambios de los valores de las variables. El mayor efecto es el relacionado con la concentración de almidón lo que significa que ésta es la variable de mayor significado.
- ❖ En la hidrólisis del almidón de yuca con la enzima *Spezyme Fred*, se encontró un máximo rendimiento del 96.7% en las siguientes condiciones: temperatura de sacarificación de 70°C, tiempo de sacarificación de 1 hora, pH de 6.0, dosis de enzima 120µl y 10% de concentración de almidón.
- ❖ El modelo matemático que describe el proceso de hidrólisis con la enzima *Spezyme Fred* contiene las variables con sus efectos demostrando la susceptibilidad del proceso a los cambios de los valores de las variables. Los

mayores efectos están relacionados con la concentración de almidón y temperatura de sacarificación al igual que la interacción entre estas, lo que significa que ésta son las variables de mayor significado.

- ❖ Para mejorar la eficiencia del etanol, se debe producir la mayor cantidad posible de glucosa en la hidrólisis enzimática, para ello es necesario combinar las dos enzimas aplicando primero la  $\alpha$  – amilasa y luego la  $\alpha$  – glucoamilasa.
- ❖ Los resultados de esta investigación demuestran claramente que es factible realizar la fermentación del almidón de Yuca en etanol a través de una previa hidrólisis del almidón puesto que los rendimientos alcanzados con las enzimas reflejan una buena productividad del biocombustible.

## 5. RECOMENDACIONES

- ❖ Se recomienda para optimizar la gelatinización del almidón de yuca, utilizar equipos que permitan controlar la velocidad de agitación y con los que se puedan determinar las etapas de gelatinización. I
- ❖ Explorar otras metodologías para determinar la cantidad de glucosa producida durante la hidrólisis del almidón como el empleo del equipo HPLC dispuesto en el laboratorio de química de la Universidad Autónoma de Occidente.
- ❖ Replicar los resultados obtenidos con volúmenes de producción mayores para confirmar los análisis reportados con las enzimas seleccionadas.
- ❖ Optimizar las etapas de fermentación y destilación para incrementar los volúmenes de producción de etanol.

## BIBLIOGRAFÍA

ABC de los alcoholes carburantes [en línea]. Bogotá: Federación Nacional de Biocombustibles, 2005. [consultado 20 de nov, 2005]. Disponible en Internet. <http://www.abcalcoholescarburantes.com>.

Alcohol orgánico: otra alternativa de diversificación [en línea]. Lima: Centro Universitario José Martí, 2005. [consultado 20 de febrero, 2006]. Disponible en Internet: <http://www.monografías.com>

Almidón [en línea]. Florida: Wikipedia, la enciclopedia libre, 2005. [Consultado 20 de oct, 2005]. Disponible en Internet: <http://es.wikipedia.org/wiki/Almid%C3%B3n>

ALTINTAS, Mete; ULGEN, Kutlu; KIRDAR, Betul; ONSAN, Ilgen; OLIVER, Stephen. Improvement of ethanol production from starch by recombinant yeast through manipulation of environmental factor [en línea]. Turkey, Enzyme and microbial technology, 2002. [consultado 04 de mar, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.elsevier.com/locate/enzmictec>.

De qué está compuesto el almidón [en línea]. Enzyme and microbial technology, 2000. [Consultado 24 nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php>.

Destilación [en línea]. Florida: Wikipedia, la enciclopedia libre, 2005. [Consultado 20 de oct, 2005]. Disponible en Internet: <http://es.wikipedia.org/wiki/>

Destilación [en línea]. Lima: Centro Universitario José Martí, 2005. [consultado 20 de feb, 2006]. Disponible en Internet: <http://www.monografias.com/trabajos15/separacion-mezclas.shtml>

El almidón [en línea]. Bogotá: [Agroindustrial Mandioca, C.A.](http://www.mandioca.com), 1998. [Consultado 20 oct, 2005]. Disponible por Internet: <http://www.mandioca.com>.ve

Enzimas de Interés Industrial [en línea]. Bogotá: Universidad Nacional, 2005. [Consultado 25 nov, 2005]. Disponible en Internet: [http://www.biogestion.unal.edu.co/proyecto\\_10.htm](http://www.biogestion.unal.edu.co/proyecto_10.htm)

Enzimas microbianas de uso industrial [en línea]. Enzyme and microbial technology, 2000. [Consultado 24 nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php>.

Extracción de almidón de yuca. Manejo integral y control de la contaminación hídrica [en línea]. ValleUniversity. Engineering Faculty, 2005. [Consultado 11 de nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://patolozunivalle.edu.co>

Glucólisis [en línea]. USA: Mathews3eCh13, 2001. [consultado 15 de feb, 2006]. Disponible en Internet: [http://www.creces.cl/new/index.asp?imat=%20%20%3E%20%2013&tc=3&nc=5&art=66 - 78k -](http://www.creces.cl/new/index.asp?imat=%20%20%3E%20%2013&tc=3&nc=5&art=66-78k-)

Gran enciclopedia Espasa, El Almidón. Tomo 1 de 20. Madrid: Espasa Calpe S.A., 2005. 506 p..

Gran enciclopedia Espasa, El Almidón. Tomo 8 de 20. Madrid: Espasa Calpe S.A., 2005. 4844 p.

Hidrólisis de un polisacárido [en línea]. México: Instituto de Química UNAM, 2003. [Consultado 18 de nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://bq.unam.mx/~evazquez>

KUNAMNENI, Adinarayana; SINGH, Suren. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of Maize starch for higher glucose production [en línea]. South Africa: Biochemical Engineering Journal, 2005. [consultado 20 nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.elsevier.com/locate/bej>.

La fermentación [en línea]. México: Journal of molecular catalysis, 2004. [consultado 05 de nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://biblioweb.unam.mx/libros/microbios/Cap16/>

Metabolismo [en línea]. ITSM, 2005. [consultado 02 de feb, 2005]. Disponible en Internet: [http://www.respiracion\\_celular/MC.Pedroayala.com](http://www.respiracion_celular/MC.Pedroayala.com).

Metabolismo I [en línea]. Educastur, 2004. [consultado 12 de dic, 2005]. Disponible en internet: <http://www.monografias.com>

Molécula de glucosa [en línea]. México: ELSEVIER, 1998. [consultado 20 dic, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.foros.bob.mx/read.php>.

MONTESIMOS, Thierry; NAVARRO, Jean Marie. Production of alcohol from raw wheat flour by amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae* [en línea]. France: Enzyme and microbial technology, 2000. [Consultado 15 de oct, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.sciencedirect.com>.

Obtención de fuentes alternas de energía [en línea]. Bogotá: Fundación ecológica de Colombia, 2005. [consultado 24 de nov, 2005]. Disponible en Internet:



<http://www.fundacionecologicadecolombia.org/BIOETANOL%20SISTEMAS%20DE%20FERMENTACION.htm>.

Polisacáridos [en línea]. Santiago de Cali: Untitled, 2005. [Consultado 31 de oct, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.aulavirtualdebiologia.com>

POOSARAN, N; HEYES, R.; ROGERS, P. Ethanol production from cassava starch using a highly productive strain of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces uvarum* ATCC 26602. [consultado 15 ene, 2006]. Disponible en Internet: <http://www.sciencedirect.com>

RATNAM, Veera; RAO, Subba; RAO, Damodara; RAO, Narasimha; CHITYALA, Ayyanna. Optimization of fermentation conditions for the production of etanol from sago starch by co-immobilized amyloglucosidase and cells of *Zymomonas mobilis* using reponse surface methodology [en línea]. USA: Enzyme and microbial technology, 2005. [Consultado 05 de oct, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.sciencedirect.com>

*Saccharomyces cerevisiae* [en línea]. México: Departamento De Genetica Molecular, Instituto De Fisiologia Celular. Universidad Nacional Autonoma De Mexico, 2003. [consultado 30 de nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://biblioweb.unam.mx/libros/microbios/Cap16/>

Se despeja el camino para los alcoholes carburantes en Colombia [en línea]. Bogotá: CORPODIB, 2005. [consultado 18 de nov, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.infocorpodib.com>.

SHIGECHI, H; UYAMA, K; FUJITA, Y; MATSUMOTO, T; UEDA, M; TANAKA, A. Efficient ethanol production from starch through development of novel flocculent

yeast strains displaying glucoamylase and co-displaying or secreting  $\alpha$ -amylase [en línea]. Journal of molecular catalysis, 2002. [consultado 25 de oct, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.elsevier.com/locate/molcatb>.

Starch [en línea]. Londres: London South Bank University, 2005. [Consultado 01 de dic, 2005]. Disponible en Internet: <http://isbu.ac.uk/water/sarch.com>

VARGAS APAZA, Luís. Selección y evaluación de bacterias del género *Bacillus* productoras de amilasa en cultivo sumergido. Lima, 2002. 79p. Trabajo de grado (Biotecnólogo). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Escuela de Post-Grado.

Vías del Catabolismo [en línea]. Educastur, 2004. [consultado 02 de dic, 2005]. Disponible en Internet: [http://wed.educastur.princast.es/proyectos/biogeov/2BCH/B3 METABOLISMO/t33 RESPIRACION/informacion.htm](http://wed.educastur.princast.es/proyectos/biogeov/2BCH/B3%20METABOLISMO/t33%20RESPIRACION/informacion.htm)

ZALDIVAR, J; ROCA, C; LE FOLL, C; OLSSON, L. Ethanolic fermentation of acid pre-treated starch industry effluents by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains [en línea]. Bioresource Technology 96, 2005. [consultado 25 de oct, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.sciencedirect.com>.

ZENÓN ROMERO, M. Producción de alcohol a partir de mandioca [en línea]. Departamento de alimentos I.N.T.N, 2005. [Consultado 15 de oct, 2005]. Disponible en Internet: <http://www.sciencedirect.com>.